

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 11 月 22 日 (22.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/88144 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04158

(22) 国際出願日: 2001 年 5 月 18 日 (18.05.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願2000-148726 2000 年 5 月 19 日 (19.05.2000) JP

特願2000-396955 2000 年 12 月 27 日 (27.12.2000) JP

特願2001-16929 2001 年 1 月 25 日 (25.01.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).

(YOKOMIZO, Satoru) [JP/JP]; 〒655-0872 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6丁目31-17 三青荘 Hyogo (JP). 福地 健 (FUKUCHI, Takeshi) [JP/JP]; 〒673-0866 兵庫県明石市朝霧町3-123 セゾン朝霧304 Hyogo (JP). 小坂田史雄 (OSAKADA, Fumio) [JP/JP]; 〒700-0063 岡山県岡山市大安寺東町17-7 Okayama (JP). 松本圭司 (MATSUMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒663-8023 兵庫県西宮市大森町11-33 Hyogo (JP). 高木正道 (TAKAGI, Masamichi) [JP/JP]; 〒183-0051 東京都府中市栄町1丁目31-10 Tokyo (JP). 太田明徳 (OHTA, Akinori) [JP/JP]; 〒331-0063 埼玉県さいたま市プラザ57-2 Saitama (JP).

(74) 代理人: 安富康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, ID, JP, KR, SG, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横溝 聡

添付公開書類:

— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: TRANSFORMANT AND PROCESS FOR PRODUCING POLYESTER BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

(57) Abstract: A gene encoding copolymerized polyester synthase; a microorganism synthesizing polyester via fermentation with the use of the above gene; and a process for producing polyester by using the above microorganism. More particularly speaking, a gene acting in a host wherein a plastic-like polymer which is degradable by microorganisms in natural environment (soil, river, ocean) can be enzymatically synthesized; a transformant having an improved ability to synthesize a plastic-like polymer by fermentation which is obtained by transforming the above gene; and a process for producing copolymerized polyester by using the above transformant.

(57) 要約:

本発明は、共重合ポリエステル合成酵素をコードする遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、自然環境（土中、河川、海中）の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子の酵素合成が可能な宿主内で機能する遺伝子、及び、同遺伝子を形質転換して得られるプラスチック様高分子を発酵合成する能力が改善された形質転換体、並びに、その形質転換体を利用した共重合ポリエステルの製造方法に関するものである。



WO 01/88144 A1

WO 01/88144 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 形質転換体およびそれを用いたポリエステルの製造方法

## 技術分野

- 5 本発明は、共重合ポリエステル合成酵素をコードする遺伝子、同遺伝子を利用してポリエステルを発酵合成する微生物、及び、その微生物を用いたポリエステルの製造方法に関する。詳しくは、宿主内で機能し、自然環境（土中、河川、海中）の下で、微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子を酵素合成する遺伝子、及び、同遺伝子を形質転換して得られるプラスチック様高分子を発酵  
10 合成する能力が改善された形質転換体、並びに、その形質転換体を利用した共重合ポリエステルの製造方法に関するものである。

## 背景技術

- 現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステル  
15 を菌体内に蓄積することが知られている。その代表例としては3-ヒドロキシ酪酸（以下3HBと略す）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P（3HB）と略す）であり、1925年にバシラス・メガテリウム（*Bacillus megaterium*）で最初に発見された。P（3HB）は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしい  
20 グリーンプラスチックとして注目されてきた。しかし、P（3HB）は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲が限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

- その中で、特開昭57-150393号公報および特開昭59-220192号公報などに3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ吉草酸（3HV）  
25 とからなる共重合体（以下P（3HB-co-3HV）と略す）の製造方法が開示されている。このP（3HB-co-3HV）はP（3HB）に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。しかしながら、実際のところP（3HB-co-3HV）は3HVモル分率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される柔軟性が向上

しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手など硬質成型体の分野にしか利用されなかった。

近年、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HHと略す）との2成分共重合ポリエステル（以下P（3HB-co-3HH）と略す）およびその製造方法について研究がなされた。たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP（3HB-co-3HH）の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）を用いてオレイン酸等の脂肪酸やオリブオイル等の油脂から発酵生産するものであった。また、P（3HB-co-3HH）の性質に関する研究もなされている（Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, *Macromolecules* 28, 4822-4823 (1995)）。この報告では炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源としてアエロモナス・キャビエを培養し、3HHが11~19mol%のP（3HB-co-3HH）を発酵生産している。このP（3HB-co-3HH）は3HHモル分率の増加にしたがって、P（3HB）の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P（3HB-co-3HV）を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。しかしながら、本製造方法では菌体生産量4g/L、ポリマー含量30%でありポリマー生産性が低いことから、実用化に向け更に高い生産性が得られる方法が探索された。

P（3HB-co-3HH）を生産するアエロモナス・キャビエよりPHA（ポリヒドロキシアリカン酸）合成酵素遺伝子がクローニングされた（T. Fukui, Y. Doi, *J. Bacteriol.*, vol. 179, No. 15, 4821-4830 (1997)、特開平10-108682）。本遺伝子をラリストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）（旧アルカリゲネス・ユートロファス（*Alcaligenes eutrophus*））に導入した形質転換株を用いてP（3HB-co-3HH）を生産を行った結果、菌体生産性は4g/L、ポリマー含量は30%であった。更に本形質転換株を炭素源として植物油脂を用いて培養した結果、菌体含量4g/L、ポリマー含量80%が達成された（T. Fukui等 *Appl. Microbiol. Bi*

otechnol. 49, 333 (1998))。また、大腸菌等の細菌や植物を宿主としたP(3HB-co-3HH)の製造方法も開示されている(WO 00/43525)。しかし、本製造法による生産性は記載されていない。

本ポリマーP(3HB-co-3HH)は3HHモル分率を変えることで、硬質ポリマーから軟質ポリマーまで幅広い物性を持つため、テレビの筐体などのように硬さを要求されるものから糸やフィルムなどのような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できる。しかしながら、これらの製造方法では本ポリマーの生産性が依然として低く、本ポリマーの実用化に向けた生産方法としては未だ不十分といわざるを得ない。

最近になって、3HBの前駆物質であるアセチルCoAを効率よく生産すると考えられる酵母を生産菌とした生分解性ポリエステルの生産研究がLeafらによって行われた(Microbiology, vol. 142, pp1169-1180 (1996))。酵母の一種であるサッカロマイセス・セルビシエ(Saccharomyces cerevisiae)にラルストニア・ユートロファのポリエステル合成酵素遺伝子を導入して形質転換体を作製し、グルコースを炭素源として培養することによってP(3HB)の蓄積(ポリマー含量0.5%)を確認している。しかし、本研究で生産されるポリマーは硬くて脆い性質を有するP(3HB)であった。

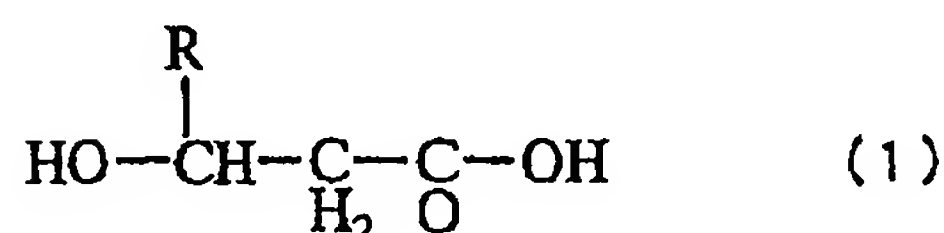
酵母は増殖が早く菌体生産性が高いことで知られている。酵母菌体は過去Single Cell Proteinとして注目され、ノルマルパラフィンを炭素源とした飼料用菌体生産が研究されたり、調味料としてその核酸成分が利用されてきた。また、ポリマーの前駆物質であるacetyl-CoAを効率よく生産すると考えられることから高いポリマー生産性が期待される。さらに、細菌と比べて菌体と培養液との分離が容易であることから、ポリマーの抽出精製工程をより簡単にすることも可能である。そこで、優れた物性を有するP(3HB-co-3HH)を酵母を用いて生産する方法が求められていた。

#### 発明の開示

本発明は、上記現状に鑑み、酵母で機能的かつ効率よく発現できるポリエステ

ル合成に関与する遺伝子、同遺伝子から成る遺伝子発現カセットを酵母に形質転換した形質転換体、及び、得られた形質転換株を培養することにより、生分解性かつ優れた物性を有するP (3HB-co-3HH) 等のポリエステルを製造する方法を提供するものである。

- 5 本発明者らは様々な検討を行った結果、下記一般式(1)に示す3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子であって、酵母で実質的に遺伝子発現可能な酵素遺伝子の一種以上のそれぞれに、酵母で実質的に機能するプロモーター、ターミネーターを連結することにより遺伝子発現カセットを作製し、さらに本遺伝子発現カセットを酵母に導入して形質転換
- 10 株を作成し、本形質転換株を培養することにより、その培養物から下記一般式(1)に示す3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造することに成功した。



- 15 式中、Rは、アルキル基を表す。

すなわち本発明は、酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子からなる遺伝子発現カセットが一種以上導入されてなることを特徴とする形質転換体である。

- 本発明はまた、上記形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、上記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取するポリエステルの製造方法である。
- 20

- ここで、「実質的」とはポリエステル合成に関与する遺伝子並びに遺伝子発現カセットの構築に必要なプロモーター、ターミネーター等の遺伝子配列は、遺伝子の機能並びに遺伝子発現に必要な機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に
- 25 欠失、置換、挿入等の変異が生じていてもよいものとする。

さらに本発明は、遺伝暗号CTGの少なくとも1つが、TTA、TTG、CTT、CTC、又はCTAに変換されていることを特徴とするポリエステルの合成



に關与する酵素遺伝子にも關する。

以下に、本發明の詳細を説明する。

#### 図面の簡単な説明

- 5 図1は、実施例2(a)においてベクターとして使用したプラスミドpSUT-5を示す模式図である。
- 図2は、実施例2(b)においてベクターとして使用したプラスミドpUTA1を示す模式図である。
- 図3は、実施例2(a)において構築したプラスミドpSUT-phaJを示す模式図である。
- 10 図4は、実施例2(a)において構築したプラスミドpSUT-PHA1を示す模式図である。
- 図5は、実施例2(a)において構築したプラスミドpSUT-PHA2を示す模式図である。
- 15 図6は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUAL1を示す模式図である。
- 図7は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUAL-ORF2を示す模式図である。
- 図8は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUAL-ORF3を示す模式図である。
- 20 図9は、実施例2(b)において構築したプラスミドpUTA-ORF23を示す模式図である。
- 図10は、実施例2(a)のプラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。
- 25 図11は、実施例2(b)のプラスミドの構築方法を示したプラスミド構築図である。
- 図12は、実施例3において製造されたポリエステルをキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した結果である。
- 図13は、実施例3において製造されたポリエステルのNMR分析のチャート

である。

図14は、実施例3において製造されたポリエステルのIR分析のチャートである。

図15は、実施例4において製造されたポリエステルのNMR分析チャートである。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### (1) 宿主

使用する酵母には特に制限はなく、菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC  
10 等）に寄託されているアシクロコニディウム属（*Aciculoconidium*属）、アンプロシオザイマ属（*Ambrosiozyma*属）、アルスロアスカス属（*Arthroascus*属）、アルキシオザイマ属（*Arxiozyma*属）、アシュビア属（*Ashbya*属）、バブジェビア属（*Babjevia*属）、ベンシングトニア属（*Bensingtonia*属）、ボトリオアスカス  
15 属（*Botryoascus*属）、ボトリオザイマ属（*Botryozyma*属）、ブレッタノマイセス属（*Brettanomyces*属）、ビュレラ属（*Bullera*属）、ビュレロマイセス属（*Bulleromyces*属）、キャンディダ属（*Candida*属）、シテロマイセス属（*Citeromyces*属）、クラビスポラ属（*Clavispora*属）、クリプトコッカス属（*Cryptococcus*属）、シストフィロバシディウム属（*Cystofilobasidium*属）、デバリオマイセス属（*Debaryomyces*属）、デッカラ属（*Dekkara*属）、ディポダスコプシス属（*Dipodascopsis*属）、ディポダスカス属（*Dipodascus*属）、エニエラ属（*Eniella*属）、エンドマイコプセラ属（*Endomycopsella*属）、エレマスカス属（*Eremascus*属）、エリモセシウム属（*Eremothecium*属）、エリスロバシディウム属（*Erythrobasidium*属）、フェロマイセス属（*Fellomyces*属）、フィロバシディウム属（*Filobasidium*属）、ガラクトマイセス属（*Galactomyces*属）、ゲオトリクム属（*Geotrichum*属）、ガイラーモンデ



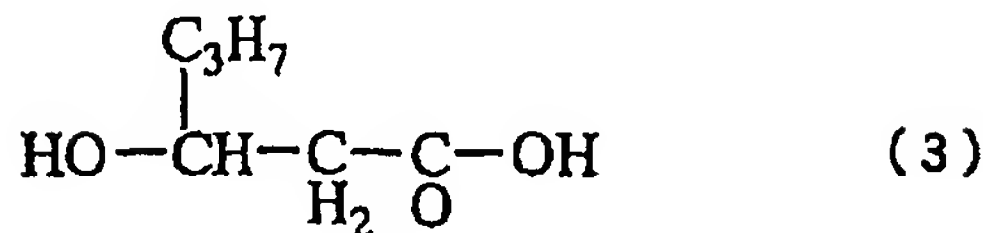
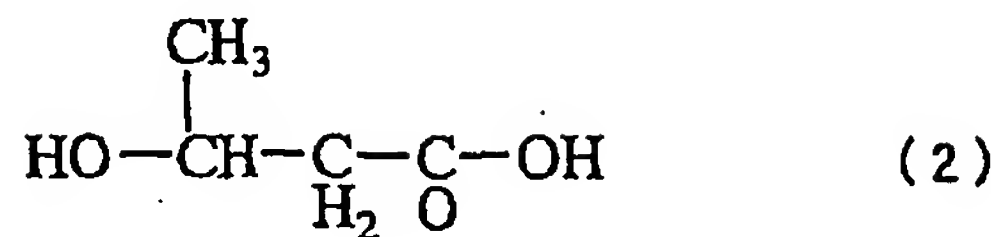
ラ属 (Guilliermondella 属), ハンセニアスポラ属 (Hanseniasporea 属), ハンセヌラ属 (Hansenula 属), ハセガワエア属 (Hasegawaea 属), ホルターマンニア属 (Holtermannia 属), ホルモアスカス属 (Hormoascus 属), ハイフオピキア属 (5 Hyphopichia 属), イサットヘンキア属 (Issatchenkia 属), クロエケラ属 (Kloeckera 属), クロエケラスポラ属 (Kloeckeraspora 属), クルイベロマイセス属 (Kluyveromyces 属), コンドア属 (Kondoa 属), クライシア属 (Kuraishia 属), クルツマノマイセス属 (Kurtzmanomyces 属), ロイコスポリ  
10 ディウム属 (Leucosporidium 属), リポマイセス属 (Lipomyces 属), ロデロマイセス属 (Lodderomyces 属), マラセジア属 (Malassezia 属), メトシュニコウニア属 (Metschnikowia 属), ムラキア属 (Mrakia 属), マイクソザイマ属 (Myxozyma 属), ナドソニア属 (Nadsonia 属), ナカザワエア属 (Nakazawaea 属), ネマトスポラ属 (Nematospora 属), オガタエア  
15 属 (Ogataea 属), オースポリディウム属 (Oosporidium 属), パチソレン属 (Pachysolen 属), ファチコスポラ属 (Phachytichospora 属), ファフィア属 (Phaffia 属), ピキア属 (Pichia 属), ロドスポリディウム属 (Rhodosporidium 属),  
20 ロドトルラ属 (Rhodotorula 属), サッカロマイセス属 (Saccharomyces 属), サッカロマイコーデス属 (Saccharomycodes 属), サッカロマイコプシス属 (Saccharomycopsis 属), サイトエラ属 (Saitoella 属), サカグチア属 (Sakaguchia 属), サターノスポラ属 (Saturnospora 属), シゾブラストスポ  
25 リオン属 (Schizoblastosporion 属), シゾサッカロマイセス属 (Schizosaccharomyces 属), シュワニオマイセス属 (Schwanniomyces 属), スポリディオボラス属 (Sporidibolus 属), スポロボロマイセス属 (Sporobolomyces 属), スポロパキデミア属 (Sporopachydermia 属), ステファノアス

カス属 (*Stephanoascus* 属), ステリグマトマイセス属 (*Sterigmatomyces* 属), ステリグマトスポリディウム属 (*Sterigmatosporidium* 属), シンビオタフリナ属 (*Symbiotaphrina* 属), シンポディオマイセス属 (*Sympodiomyces* 属), シン  
5 ポディオマイコプシス属 (*Sympodiomyopsis* 属), トルラスポ  
ラ属 (*Torulaspora* 属), トリコスポリエラ属 (*Trichosporiella* 属), トリコスポロン属 (*Trichosporon* 属), トリゴ  
ノプシス属 (*Trigonopsis* 属), ツチヤエア属 (*Tsuchiyaea* 属), ウデニオマイセス属 (*Udeniomyces* 属), ワルトマイセス属  
10 (*Waltonomyces* 属), ウィカーハミア属 (*Wickerhamia* 属)  
, ウィカーハミエラ属 (*Wickerhamiella* 属), ウィリオプシス属  
(*Williopsis* 属), ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma* 属),  
ヤロウシア属 (*Yarrowia* 属), ザイゴアスカス属 (*Zygoascus*  
属), ザイゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces* 属),  
15 ザイゴウィリオプシス属 (*Zygowilliopsis* 属) 又はザイゴザイマ  
属 (*Zygozyma* 属などの酵母を使用することができる。

また、本発明の形質転換体において用いられる酵母として、キャンディダ・マル  
ルトーサ (*Candida maltosa*)、ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) が好ましいが、特にキャンディダ・マル  
20 トーサが好ましい。

## (2) ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子としては特に限定されないが、細菌由  
来の酵素をコードする遺伝子が好ましい。具体的には、上記一般式 (1) で示さ  
れる 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの合成に関与する  
25 酵素遺伝子が好ましく、下記式 (2) で示される 3-ヒドロキシ酪酸と下記式 (3)  
で示される 3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステル  
P (3HB-co-3HH) の合成に関与する酵素遺伝子であることがより好  
ましい。



上記一般式 (1) で示される 3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリ  
 エステルの合成に関与する酵素遺伝子としては特に限定されず、例えば特開平 1  
 5 0-108682号公報に記載されているポリエステル合成酵素遺伝子を用いる  
 ことができる。上記ポリエステル合成酵素遺伝子としては、例えば、PHA合成  
 酵素遺伝子があげられる。また、本ポリエステル合成酵素遺伝子と共にポリエ  
 テル合成に関与する酵素遺伝子を用いても良い。これらの酵素遺伝子としては、  
 たとえば、β酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである (R)-3-  
 10 ヒドロキシアシルCoAに変換する (R) 体特異的エノイルCoAヒドラターゼ  
 遺伝子 (T. Fukui, et al FEMS Microbiology L  
 etters, vol. 170, 69-75 (1999) ) や、アセチルC  
 oAを二量化してモノマーである 3-ヒドロキシブチリルCoAを合成するβケ  
 トチオラーゼ遺伝子、NADPH依存性アセトアセチルCoA還元酵素遺伝子 (   
 15 Peoples OP, et al J. Biol. Chem. 264 (26)  
 15298-15303 (1989) ) などが挙げられる。

上記宿主酵母の中には遺伝暗号読みとり異常を示す場合がある。例えばキャ  
 ンディダ・シリンドラセア (Candida cylindracea) (Y.  
 Kawaguchi et al, Nature 341 164-166 (1.  
 20 989) ) やカンディダ・マルトーサ (H. Sugiyama et al,  
 Yeast 11 43-52 (1995) ) では遺伝暗号CTGが、ロイシン  
 ではなくセリンに翻訳される特殊な酵母である。このような酵母では、ポリエ  
 テル合成に関与する酵素遺伝子を発現させる場合、遺伝暗号の読みとり異常が生  
 じることから、当該酵素のアミノ酸配列の異なった酵素が生産されることがある  
 25 。その結果、当該酵素の機能が十分発揮できない。

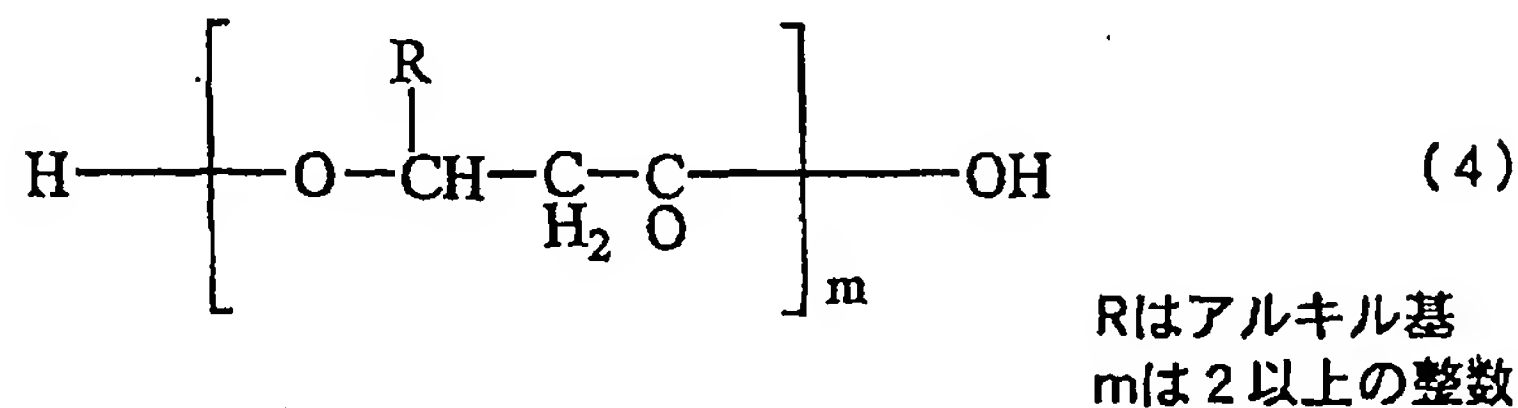
このような現象は、予め遺伝子内に含まれる遺伝暗号CTGをロイシンに対応する他の遺伝暗号(TTA, TTG, CTT, CTC, CTA)に改変した遺伝子を使用することによって避けることができる。

また、酵母を含む生物の遺伝暗号解析の結果、遺伝暗号の使用頻度は生物によって大きく異なることが明らかになっている。すなわち、複数ある同一アミノ酸を指定する遺伝暗号のうち使用される遺伝暗号は生物によって偏りが認められ、使用頻度の高い遺伝暗号から成る遺伝子の翻訳効率が高いことが指摘されている。例えばアエロモナス・キャビエのPHA合成酵素遺伝子や(R)体特異的エノイルCoAヒドラーゼ遺伝子のGC含量はそれぞれ67.16%、65.77%  
10 %であるが、キャンディダ・マルトーサで現在までに報告されている酵素、例えばホスホグリセリン酸キナーゼでは39.55%またALK2-Aでは35.67%である。したがって、例えばポリエステル合成に関与する遺伝子をキャンディダ・マルトーサにおいて効率よく発現させるためには、前記の遺伝暗号CTGを他のロイシン対応遺伝暗号に改変することに加えて、キャンディダ・マルト  
15 ーサにおいて使用頻度の高い遺伝暗号に改変した当該遺伝子を使用することが好ましい。

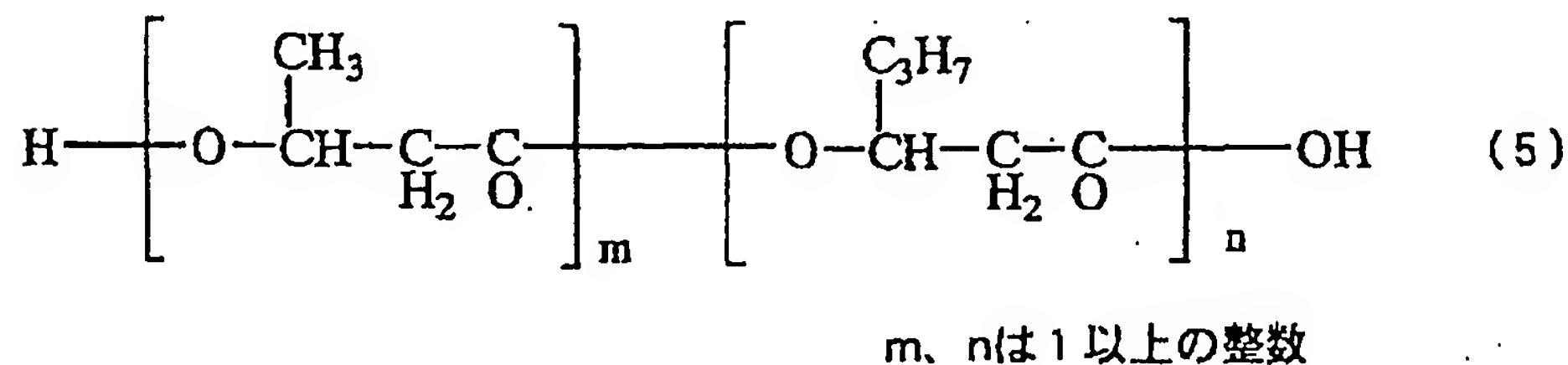
本ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子は、遺伝暗号に読みとり異常を示さない酵母では、前記酵素遺伝子をそのまま利用しても良いし、アミノ酸配列を変更することなく当該酵母において使用頻度の高い遺伝暗号に改変した遺伝子を利用しても良い。また、遺伝暗号に読みとり異常を示す酵母では、前記酵素遺伝子のCTGコドンをTTA, TTG, CTT, CTCまたはCTAに改変した遺伝子を利用しても良い。さらに、アミノ酸配列を変更することなく当該酵母において使用頻度の高い遺伝暗号に改変した遺伝子を利用しても良い。例えば、キャン  
20 ディダ・マルトーサを宿主とした場合、本ポリエステル合成に関与する遺伝子として配列番号3、配列番号4に示される遺伝子を利用することができる。上記遺伝子の塩基配列は、本ポリエステルの合成に関与する酵素を生産するものであれば、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、挿入等の変異が生じていてもよい。

また、上記PHA合成酵素によって合成されるポリエステルは、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるものであり、下記一

般式(4)に示される。より好ましい態様においては、上記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)であり、下記一般式(5)に示される。



5



### (3) 遺伝子発現カセットの構築

酵母における遺伝子発現のためには、当該遺伝子の5'上流にプロモーター、UAS等のDNA配列の連結、当該遺伝子の3'下流にポリA付加シグナル、ターミネーター等のDNA配列の連結が必要である。これらのDNA配列は酵母で機能する配列であればどのような配列でも利用できる。プロモーターには構成的に発現を行うものや誘導的に発現を行うものがあるが、いずれのプロモーターも用いてもよい。

また、本発明の形質転換体においては、上記プロモーター、ターミネーターは、ポリエステルの生産に使用する生物において機能するものであるものが好ましい。

以下、本発明の形質転換体に用いられる遺伝子発現カセット構築の例として、(a)宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合、(b)宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合について具体的に説明する。

20

(a) 宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合

宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用する場合は、使用するプロモーター、ターミネーターは、ヤロウィア・リポリティカ由来であることが好ましい。より好ましくは、ヤロウィア・リポリティカ A L K 3 由来のプロモーター、ヤロウィア・リポリティカ X R P 2 由来のターミネーターであることが好ましい。なお、上記プロモーター及び／又はターミネーターの DNA 配列は、ヤロウィア・リポリティカで機能する配列であれば、1 つ若しくは複数の塩基が欠失、置換及び／又は、付加された DNA 配列であってもよい。

構築に用いられるベクターは、大腸菌において自立増殖するプラスミドであればどのようなベクターでもよく、更に酵母において自立増殖可能な領域を合わせ持っていてよい。酵母において自立増殖できるベクターでは、菌体内に保持される。また、遺伝子発現カセットを染色体上に組み込むこともできる。ヤロウィア・リポリティカにおいては、自立増殖可能な p S A T 4 や p S U T 5 を用いることができる（1997年度 東京大学大学院、博士論文「酵母 *Yarrowia lipolytica* の n-アルカン誘導型チトクローム P 4 5 0 遺伝子群に関する研究」飯田敏也）。

上記酵母においては、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子であることが好ましく、例えば、*A. caviae* 由来の PHA 合成酵素遺伝子（以下 *phaC* と略す）（配列番号 1）、または、*phaC* および  $\beta$  酸化経路の中間体のエノイル CoA をモノマーである (R) - 3 - ヒドロキシアシル CoA に変換する (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラターゼ遺伝子（以下 *phaJ* と略す）（T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999)）（配列番号 2）が好適に用いられる。

これらの構造遺伝子のそれぞれ 5' 上流にヤロウィア・リポリティカ A l k 3 遺伝子のプロモーター A L K 3 p（配列番号 5）（GenBank AB010390）を連結することができる。

プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR 法が利用できる。PCR に用いたプライマー配列を配列番号 8 から



配列番号14に示す。PCRの条件は目的遺伝子断片が増幅できればどのような条件を用いてもよい。

プロモーター部分は配列番号5を鋳型にして配列番号8と配列番号9、配列番号9と配列番号10を用いて、それぞれ5'末端がXbaI、3'末端がNdeIのALK3Xと5'末端がSacII、3'末端がNdeIのALK3Sを作製することができる。phaCは配列番号1を鋳型にして配列番号11と配列番号12とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がPstIである約100bpの断片を作製することができる。これに残りのPstI-BamHI約1700bpを結合して、5'末端がNdeI、3'末端がBamHIである完全長のphaCを作製することができる。phaJは配列番号2を鋳型にして配列番号13と配列番号14とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がKpnIであるphaJを作製することができる。ベクターにはプラスミドpSUT5（図1、配列番号19）とpSUT5のNdeIサイトを配列番号20のリンカーDNAを用いて、XbaIサイトに変更したベクターpSUT6とを使用することができる。pSUT6のマルチクロニングサイトのSacII、KpnIサイトにALK3SとphaJとを結合し、プラスミドpSUT-phaJ（図3）を構築することができる。次にpSUT5のマルチクロニングサイトのXbaI、BamHIサイトにALK3XとphaCとを結合し、プラスミドpSUT-PHA1（図4）を構築することができる。

さらにプラスミドpSUT-phaJからSacIIとXbaIとを用いて、ALK3SとphaJと下流にあるターミネーターとを一緒に切り出し、プラスミドpSUT-PHA1のSacII、XbaIサイトに結合したプラスミドpSUT-PHA2（図5）の二種類の組換え用プラスミドを構築することができる。

25 以上の方法により、酵母ヤロウィア・リポリティカにおいて上記一般式（1）で示される3-ヒドロキシアルカン酸を重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

（b）宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合

宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合は、使用するプロモーター、ターミネーターがキャンディダ・マルトーサで機能するものであることが好ましく、キャンディダ・マルトーサ由来であることがより好ましい。さらに好ましくは、キャンディダ・マルトーサ A L K 1 由来のプロモーター及びターミネーターを利用する。なお、上記プロモーター及び／又はターミネーターの DNA 配列は、キャンディダ・マルトーサで機能する配列であれば、1つ若しくは複数の塩基が欠失、置換及び／又は、付加された DNA 配列であってもよい。

構築に用いられるベクターとして、上記 (a) で言及したものと同様のものが挙げられる。キャンディダ・マルトーサにおいては、自立増殖可能な p U T U 1 を用いることができる (M. O h k u m a , e t a l J. B i o l. C h e m. , v o l. 2 7 3, 3 9 4 8 - 3 9 5 3 (1 9 9 8) ) 。

宿主としてキャンディダ・マルトーサを使用する場合は、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ由来の酵素と同じアミノ酸配列をコードする遺伝子であることが好ましく、例えば、アエロモナス・キャビエ由来の P H A 合成酵素アミノ酸配列と同じアミノ酸配列をキャンディダ・マルトーサにおいてコードする遺伝子 (以下 O R F 2 と略す、配列番号 3) 、または、O R F 2 及び  $\beta$  酸化経路の中間体のエノイル C o A をモノマーである (R) - 3 - ヒドロキシアシル C o A に変換する (R) 体特異的エノイル C o A ヒドラーゼと同じアミノ酸配列をキャンディダ・マルトーサにおいてコードする遺伝子 (以下 O R F 3 と略す、配列番号 4) が好適に用いられる。 (T. F u k u i , e t a l F E M S M i c r o b i o l o g y L e t t e r s , v o l. 1 7 0, 6 9 - 7 5 (1 9 9 9) )

これらの構造遺伝子のそれぞれ 5' 上流にキャンディダ・マルトーサの A l k 1 遺伝子のプロモーター A L K 1 p (配列番号 6) 、3' 下流にターミネーター A L K 1 t (配列番号 7) (G e n B a n k D 0 0 4 8 1) (M. T a k a g i , e t a l A g r i c. B i o l. C h e m. , v o l. 5, 2 2 1 7 - 2 2 2 6 (1 9 8 9) ) を連結することができる。

プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためには、P C R 法が利用できる。P C R に用いるプライマー配列

は配列番号15から配列番号18に示す。PCRの条件は(a)で上述した条件を用いることができる。

プロモーター部分は配列番号6を鋳型にして配列番号15と配列番号16を用いて、5'末端がSalI、3'末端がNdeIのALK1pを作製することができる。ターミネーター部分は配列番号7を鋳型にして配列番号17と配列番号18を用いて、5'末端がHindIII、3'末端がEcoRVのALK1tを作製することができる。ベクターにはpUTU1とキャンディダ・マルトーサのAde1遺伝子(配列番号21、GenBank D00855)(S. Kawai, et al, Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65 (1991))を用いて、マーカー遺伝子をUra3からAde1に変更したベクターpUTA1(図2)を使用することができる。pUCNT(WO 94/03613に記載)のPvuII、NdeIサイトにALK1pを結合し、またpUCNTのHindIII、SspIサイトにALK1tを結合してpUAL1(図6)を構築することができる。次にpUAL1のNdeI、PstIサイトにORF2を結合し、プラスミドpUAL-ORF2(図7)を構築することができる。また、pUAL1を構築する途中に構築するpUCNT-ALK1tのNdeI、HindIIIサイトにORF3を結合し、さらにALK1pを結合することで、pUAL-ORF3(図8)を構築することができる。

つぎに、プラスミドpUAL-ORF2からEcoT22Iを用いて、ORF2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA1のPstIサイトに結合し、pUTA-ORF2を構築することができる。

さらに、pUAL-ORF3からSalIを用いてORF3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA-ORF2のSalIサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF23(図9)を構築することができる。

以上の方法により、酵母キャンディダ・マルトーサにおいて上記一般式(1)で示されるアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築することができる。

#### (4) 形質転換体の作製

酵母にポリマー合成に関与する遺伝子発現カセット組換えベクターを導入するためには、公知の方法により行うことができる。例えば、カルシウム法 (L e d  
5 e r b e r g . E . M . e t a l . , J . B a c t e r i o l . 119 .  
1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (C u r r e n t P r o  
t o c o l s i n M o r e c u l a r B i o l o g y , 1 巻、 1 . 8 . 4  
頁、1994年) 等を用いることができる。また、F a s t T r a c k <sup>TM</sup> - Y  
e a s t T r a n s f o r m a t i o n K i t <sub>SM</sub> (G e n o T e c h n o l  
10 o g y) のような市販の形質転換キットを利用することもできる。

例えば、宿主として、ヤロウイア・リポリティカCXAU1株 (T . I i d  
a , e t a l Y e a s t , 14 , 1387-1397 (1998)) を用  
いることができる。本菌株に上記の形質転換法を用いてポリマー合成に関与す  
る遺伝子発現カセットを形質転換し、pSUT-PHA1を有するヤロウイア  
15 ・リポリティカPHA1株と、pSUT-PHA2を有するヤロウイア・リポ  
リティカPHA2株を作製することができる。

また宿主として、キャンディダ・マルトーサCHA1株 (S . K a w a i ,  
e t a l , A g r i c . B i o l . C h e m . , v o l . 55 , 59-65  
(1991).) を用いることもできる。本菌株に上記の形質転換法を用いてポリ  
20 マー合成に関与する遺伝子発現カセットを形質転換し、pUTA-ORF23を  
有するキャンディダ・マルトーサCHA1株を作製することができる。

#### (5) ポリエステルの製造

本発明のポリエステルの製造方法では、本発明の形質転換体を培養して得られ  
25 る培養物から、ポリエステルを採取する。

本発明の形質転換体を培養することによるポリエステルの製造は、次のように  
して行うことができる。培養に用いる炭素源としては、酵母が資化できるもので  
あればどのようなものでもよい。また、プロモーターの発現が誘導型である場合  
には、適時誘導物質を添加すればよい。誘導物質が主要炭素源である場合もある

。炭素源以外の栄養源としては窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地が使用できる。培養温度はその菌の生育可能な温度であればよいが、20℃から40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。その後、得られた該培養菌体又は培養物からポリエステルを回収すればよい。

- 5 炭素源としてはグルコース、グリセリン、シュクロース等の炭水化物や油脂類や脂肪酸類さらにはn-パラフィン等を用いることができる。油脂としては、例えばナタネ油、ヤシ油、パーム油、パーム核油などが挙げられる。脂肪酸としてはヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、ミリスチン酸などの飽和・不飽和脂肪酸、あるいはこれら脂肪酸のエステルや塩など脂肪酸誘導体が挙げられる。例えば、キャン
- 10 ディダ・マルトーサの培養及びヤロウィア・リポリティカの培養において、炭素源として油脂を用いて培養することもできる。また、油脂を資化ができないかまたは効率よく資化できない酵母では、培地中にリパーゼを添加することによって改善することもできる。さらに、リパーゼ遺伝子を形質転換することにより、油
- 15 脂資化能を付与することもできる。

また、炭素源として奇数の炭素鎖を有する脂肪酸やn-パラフィン等を用いた場合、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルの炭素鎖に奇数成分の割合を高めることができる。

- 窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、
- 20 リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどが挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

- その他の有機栄養源としてはアミノ酸類、例えばグリシン、アラニン、セリン
- 25 、スレオニン、プロリンなどや、ビタミン類、例えばビタミンB1、ビタミンB12、ビオチン、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ビタミンC等が挙げられる。

本発明において、ポリエステルの菌体からの回収は例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器などで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロ



ロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。沈殿したポリエステルを濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収することができる。得られたポリエステルの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

本発明のポリエステルの製造方法は、上述のような構成からなるので、上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを生産性良く製造することができる。

10    また、上述したプラスミドpSUT-PHA1、pSUT-PHA2を有するヤロウィア・リポリティカ組み換え株、プラスミドpUTA-ORF23を有するキャンディダ・マルトーサ組み換え株等を作製し、培養する方法により、上記一般式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と上記一般式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)を製造することができる。

## 実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

20    (実施例1) ポリエステル合成に関与する遺伝子

(a) 宿主としてヤロウィア・リポリティカを使用した場合

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロモナス・キャビエの由来のPHA合成酵素遺伝子(phaC; 配列番号1)と、β酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoAヒドラターゼ遺伝子(phaJ; 配列番号2)

25    (T. Fukui, et al FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))を使用した。

(b) キャンディダ・マルトーサを宿主として使用した場合

ポリエステル合成に関与する酵素遺伝子として、アエロモナス・キャビエの由



来のPHA合成酵素と、 $\beta$ 酸化経路の中間体のエノイルCoAをモノマーである  
(R)-3-ヒドロキシアシルCoAに変換する(R)体特異的エノイルCoA  
ヒドラターゼ(T. Fukui, et al. FEMS Microbiology Letters, vol. 170, 69-75 (1999))のアミ  
5 ノ酸配列をもとに、当該酵素遺伝子を合成した。

キャンディダ・マルトーサはCTGコドンをロイシンではなくセリンに翻訳す  
る酵母である。このため、キャンディダ・マルトーサにおいて使用するにあたり  
、ロイシンコドンにはCTGを割り当てなかった。各アミノ酸に対応するコドン  
はキャンディダ・マルトーサにおいて使用頻度の高いコドンを優先的に選択し  
10 た。コドンの使用頻度はKlaus Wolf著のNonconventional Yeast in Biotechnology (Springer出版  
)を参考にした。具体的には、メチオニン、トリプトファンは、それぞれをAT  
G、TGGを割り当てた。フェニルアラニンでは、TTTとTTCを交互に割り  
当てた。ロイシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるCTCをT  
15 TA、CTGをTTGにそれぞれ変換し、TTAとTTGはそのまま用いた。イ  
ソロイシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列におけるATCをATT、  
ATAをATCにそれぞれ変換し、ATTはそのまま用いた。バリンでは、アエ  
ロモナス・キャビエDNA配列におけるGTGをGTT、GTAをGTTにそれ  
ぞれ変換し、GTCとGTTはそのまま用いた。セリンでは、アエロモナス・キ  
20 ャビエDNA配列におけるAGCをTCT、TCAをTCT、TCGをTCTに  
それぞれ変換し、TCCとTCTはそのまま用いた。プロリンでは、対応するコ  
ドンを全てCCAに変換した。スレオニンでは、アエロモナス・キャビエDNA  
配列におけるACCをACT、ACGをACC、ACAをACCにそれぞれ変換  
し、ATCはそのまま用いた。アラニンでは、アエロモナス・キャビエDNA配  
25 列におけるGCCをGCT、GCGをGCC、GCAをGCTにそれぞれ変換し  
、GCTはそのまま用いた。チロシンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列  
におけるチロシンコドンに対して、TAT、TACを交互に割り当てた。終始コ  
ドンは、TAAを用いた。ヒスチジンでは、アエロモナス・キャビエDNA配列  
におけるヒスチジンコドンに対して、CAT、CACを交互に割り当てた。グル

タミンでは、対応するコドン全てCAAに変換した。アスパラギンでは、対応するコドンに対してAATとAACを交互に割り当てた。リジンでは、対応するコドン全てAAAに変換した。アスパラギン酸では、対応するコドン全てGATに変換した。グルタミン酸では、対応するコドン全てGAAに変換した。  
5 。システインでは、対応するコドン全てTGTに変換した。アルギニンでは、対応するコドン全てAGAに変換した。グリシンでは、対応するコドン全てGGTに変換した。さらにアエロモナス・キャビエの由来のPHA合成酵素DNA配列において、2箇所のKpnI部位を作成するために、969番目のTをC、1449番目のTをCに変換した。これらの置換によって当該遺伝子のアミノ  
10 酸配列構造は変更されない。

このようにしてPHA合成酵素遺伝子（ORF 2；配列番号3）と（R）体特異的エノイルCoAヒドラーゼ遺伝子（ORF 3；配列番号4）を設計し、これらの配列を元にORF 2とORF 3を全合成した。

## 15 （実施例2）組換えプラスミドおよび組換え株の構築

### （a）宿主としてヤロウシア・リポリティカを使用した場合

上記遺伝子がヤロウシア・リポリティカで発現するように、それぞれの5'上流にヤロウシア・リポリティカのAlk3遺伝子のプロモーターALK3p（配列番号5）（GenBank AB010390）を連結することにした。  
20 プロモーターと構造遺伝子とを連結するための制限酵素部位を作製するためには、PCR法を利用した。PCRに用いたプライマー配列を配列番号8から配列番号14に示す。PCRの条件は94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分を1サイクルとし、これを25回繰り返して、目的遺伝子断片を増幅した。ポリメラーゼは宝酒造（株）のExTaqを使用した。プロモーター部分は配  
25 列番号5を鋳型にして配列番号8と配列番号9、配列番号9と配列番号10を用いて、それぞれ5'末端がXbaI、3'末端がNdeIのALK3Xと5'末端がSacII、3'末端がNdeIのALK3Sとを作製した。

phaCは配列番号1を鋳型にして配列番号11と配列番号12とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がPstIである約100bpの断片を作製し

た。これに残りのPstI-BamHI断片約1700bpを結合して、5'末端がNdeI、3'末端がBamHIである完全長のphaCを作製した。phaJは配列番号2を鋳型にして配列番号13と配列番号14とを用いて、5'末端がNdeI、3'末端がKpnIであるphaJを作製した。

- 5 ベクターにはプラスミドpSUT5 (図1、配列番号19) とpSUT5のNdeIサイトを配列番号20のリンカーDNAを用いて、XbaIサイトに変更したベクターpSUT6とを使用した。pSUT6のマルチクローニングサイトのSacII、KpnIサイトにALK3SとphaJjとを結合し、プラスミドpSUT-phaJ (図3) を構築した。次にpSUT5のマルチ
- 10 クローニングサイトのXbaI、BamHIサイトにALK3XとphaCとを結合し、プラスミドpSUT-PHA1 (図4) を構築することができる。

- さらにプラスミドpSUT-phaJからSacIIとXbaIとを用いて、ALK3SとphaJと下流にあるターミネーターとを一緒に切り出し、同DNAをプラスミドpSUT-PHA1のSacII、XbaIサイトに挿入することによりプラスミドpSUT-PHA2 (図5) を構築した。すなわち、
- 15 このようにして二種類の組換え用プラスミドpSUT-PHA1とpSUT-PHA2を構築した。以上の方法により、酵母ヤロウィア・リポリティカにおいて上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。全体の構築図
- 20 を図10に示した。

- 宿主にはヤロウィア・リポリティカCXAU1株 (T. Iida, et al Yeast, 14, 1387-1397 (1998)) を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast Track<sup>TM</sup>-Yeast Transformation Kit<sub>SM</sub> (Geno Technology) を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート (0.6
- 25 7w/v% Yeast Nitrogen base without amino acid、2w/v% グルコース、24mg/L アデニン塩酸塩、2w/v% 寒天) を使用して組換え株を取得した。

(b) キャンディダ・マルトーサを宿主として使用した場合

上記ORF 2、ORF 3がキャンディダ・マルトーサで発現するように、それぞれの5' 上流にキャンディダ・マルトーサのA l k 1遺伝子のプロモーターA L K 1 p (配列番号6、G e n B a n k D 0 0 4 8 1) を、3' 下流にキャンディダ・マルトーサのA l k 1遺伝子のターミネーターA L K 1 t (配列番号7) を連結することにした。プロモーターおよびターミネーターと構造遺伝子を連結するための制限酵素部位を作成するためには、P C R法を利用した。P C Rに用いたプライマー配列を配列番号15から配列番号18に示す。P C Rの条件は94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分を1サイクルとし、これを25回繰り返して、目的遺伝子断片を増幅した。ポリメラーゼは宝酒造(株)のE x T a qを使用した。プロモーター部分は配列番号6を鋳型にして配列番号15と配列番号16を用いて、5' 末端がS a l I、3' 末端がN d e IのA L K 1 pを作製した。ターミネーター部分は配列番号7を鋳型にして配列番号17と配列番号18を用いて、5' 末端がH i n d I I I、3' 末端がE c o R VのA L K 1 tを作製した。最終的にORF 2とORF 3を連結するベクターにはp U C 1 9にキャンディダ・マルトーサの自己複製領域(A R S) (G e n B a n k D 2 9 7 5 8) およびU R A 3遺伝子(G e n B a n k D 1 2 7 2 0) を連結したp U T U (M. O h k u m a, e t a l, J. B i o l. C h e m., v o l. 2 7 3, 3 9 4 8 - 3 9 5 3 (1 9 9 8)) とキャンディダ・マルトーサのA D E 1遺伝子(配列番号21、G e n e b a n k D 0 0 8 5 5) を用いて、マーカー遺伝子をU r a 3からA d e 1に変更したベクターであるp U T A 1 (図2)を使用した。p U T A 1は、p U T U 1からX h o Iを用いてU R A 3遺伝子を除去し、これにS a l Iを用いて切り出したA D E 1遺伝子断片を接続し構築した。

p U C N T (W O 9 4 / 0 3 6 1 3 に記載) のP v u I I、N d e IサイトにA L K 1 pを結合し、またp U C N TのH i n d I I I、S s p IサイトにA L K 1 tを結合してp U A L 1 (図6)を構築した。次にp U A L 1のN d e I、P s t IサイトにORF 2を結合し、プラスミドp U A L - O R F 2 (図7)を構築した。また、p U A L 1を構築する途中に構築するp U C N T - A L K 1 t

のNde I、Hind IIIサイトにORF 3を結合し、さらにALK 1 pを結合することで、pUAL-ORF 3 (図8)を構築した。

つぎに、プラスミドpUAL-ORF 2からEcoT 22 Iを用いて、ORF 2とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA 1のPst Iサイトに結合し、pUTA-ORF 2を構築した。さらに、pUAL-ORF 3からSal Iを用いてORF 3とともに上流にあるプロモーター、下流にあるターミネーターを一緒に切り出し、pUTA-ORF 2のSal Iサイトに結合したプラスミドpUTA-ORF 2 3 (図9)を構築した。以上の方法により、酵母キャンディダ・マルトーサにおいて上記一般式 (1) で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなるポリエステルを製造するための遺伝子発現カセットを構築した。全体の構築図を図11に示した。

宿主にはキャンディダ・マルトーサCHA 1株 (S. Kawai, et al, Agric. Biol. Chem., vol. 55, 59-65 (1991)) を使用した。宿主に構築したプラスミドを導入するために、Fast Track<sup>TM</sup>-Yeast Transformation Kit<sub>SM</sub> (Geno Technology) を使用した。プロトコルにしたがって操作し、選択プレート (0.67 w/v % Yeast Nitrogen base without amino acid、2 w/v % グルコース、24 mg/L ヒスチジン、2 w/v % 寒天) を使用して組換え株を取得した。

20

(実施例3) ヤロウィア・リポリティカ組換え株を用いたP (3HB-co-3HH) の生産

プラスミドpSUT 5、pSUT-PHA 1、pSUT-PHA 2を有するヤロウィア・リポリティカ組換え株を次のように培養した。前培地はYPD培地 (1 w/v % Yeast-extract、2 w/v % Bacto-Pepton、2 w/v % グルコース) を使用した。ポリエステル生産培地には1/4 YP培地 (0.25 w/v % Yeast-extract、0.5 w/v % Bacto-Pepton) とミネラル培地 (0.7 w/v %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.3 w/v %  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、0.5 w/v % プロエキスAP-1



2 (播州調味料)、0.04 w/v % アデニン、1 ppm チアミン塩酸塩、1  
v/v % 微量金属塩溶液 (0.1 N 塩酸に 8 w/v %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、  
0.6 w/v %  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.9 w/v %  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、  
0.05 w/v %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.1 w/v %  $\text{MnSO}_4 \cdot 6-7$   
5  $\text{H}_2\text{O}$ 、1 w/v %  $\text{NaCl}$ ) にパーム油を 2 w/v % を添加したものを使  
用した。

各組換え株のグリセロールストック 100  $\mu\text{l}$  を 100 ml の前培地が入っ  
た 500 ml 坂口フラスコに接種して 20 時間培養し、500 ml の生産培地  
を入れた 2 L 坂口フラスコに 1 v/v % 接種した。これを培養温度 30 °C、振  
10 盪速度 120 rpm、培養時間は、YPD 培地で 24 時間、ミネラル培地で 7  
2 時間という条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって  
菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定し  
た。

得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを 100 ml 添加し一晚攪拌して  
15 抽出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで 1-2 ml にまで  
濃縮し、濃縮液に 10 ml のヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させ  
た。

得られたヘキサン不溶物約 2 mg に 500  $\mu\text{l}$  の硫酸-メタノール混液 (1  
5 : 85) と 500  $\mu\text{l}$  のクロロホルムとを添加して密栓し、100 °C で 14  
20 0 分間加熱することでポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、  
これに 0.3 g の炭酸水素ナトリウムを添加し、中和した。これに 1 ml のジ  
イソプロピルエーテルを添加して攪拌機を用いて攪拌した。遠心分離して有機  
溶媒層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分  
析した。ガスクロマトグラフは島津製作所 GC-17A、キャピラリーカラム  
25 は GLサイエンス社製 NEUTRA BOND-1 (カラム長 25 m、カラム  
内径 0.25 mm、液膜厚 0.4  $\mu\text{m}$ ) を用いた。温度条件は、初発温度 10  
0 °C から 8 °C/分の速度で昇温した。得られた分析結果を表 1 に、またその時  
のサンプル (3) のチャートを図 12 に示す。また、得られたヘキサン不溶物  
の NMR 分析 (JEOL、JNM-EX400)、IR 分析 (島津製作所、D



R-800) も行った。その一例としてサンプル (6) の結果を図 13、図 14 に示す。

表 1 培養および分析結果

サンプル	培地	菌株	菌体量 (g/L)	ポリマー蓄積量 (wt%)	3HH分率 (mol%)
(1)	1/4YP培地	コントロール	3.56	$8.9 \times 10^{-2}$	15(GC測定)
(2)		PHA1株	3.65	$1.9 \times 10^{-1}$	
(3)		PHA2株	3.43	$2.6 \times 10^{-1}$	
(4)	ミネラル培地	コントロール	0.15	$6.7 \times 10^{-2}$	27(NMR測定)
(5)		PHA1株	0.19	$1.4 \times 10^{-1}$	
(6)		PHA2株	0.17	1.8	

この結果から、酵母ヤロウィア・リポリティカを用いて共重合ポリエステル P (3HB-co-3HH) が生産できることがわかった。

また、酵母にもごく僅かながらポリマーが存在することがわかった。

(実施例 4) キャンディダ・マルトーサ組換え株を用いた P (3HB-co-3HH) の生産

10 プラスミド pUTA1, pUTA-ORF23 を有するキャンディダ・マルトーサ組換え株を次のように培養した。前培地は YNB 培地 (0.67 w/v % Yeast Nitrogen base without amino acid) に 1 w/v % カザミノ酸、2 w/v % パーム油添加した培地を使用した。ポリエステル生産培地は YNB 培地に 1 w/v % カザミノ酸を添加し、炭素源として①  
15 2 w/v % パーム油、② 2 w/v % ヤシ油、③ 2 w/v % テトラデカン、④ 2 w/v % ヘキサデカンを添加した培地を使用した。

各組換え株のグリセロールストック 100  $\mu$ l を 50 ml の前培地が入った 500 ml 坂口フラスコに接種して 20 時間培養し、500 mL の生産培地を入れた 2 L 坂口フラスコに 10 v/v % 接種した。これを培養温度 30  $^{\circ}$ C、振盪速度  
20 120 rpm、培養時間は 72 時間という条件で培養した。培養液をオートクレーブ後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄した後、凍結乾燥して乾燥菌体重量を測定した。

得られた乾燥菌体を粉碎し、クロロホルムを 100 ml 添加し一晚攪拌して抽

出した。濾過して菌体を除去し、ろ液をエバポレーターで1-2mlにまで濃縮し、濃縮液に10mlのヘキサンを添加して、ヘキサン不溶物を析出させた。

その結果、プラスミドpUTA-ORF23を導入した組換え株をヤシ油、テトラデカン、ヘキサデカンで培養したものに白色沈殿が見られた(表2)。ヤシ油で培養したときに得られたヘキサン不溶物のNMR分析(JEOL、JNM-EX400)の結果を表2、図15に示す。

表2 組換え株培養結果

炭素源	菌体量(g/L)	ポリマーの蓄積
パーム油	12.5	—
ヤシ油	10.3	++
テトラデカン	4.4	+
ヘキサデカン	3.6	+

この結果から、酵母キャンディダ・マルトーサを用いて共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)が生産できることがわかった。

#### 産業上の利用可能性

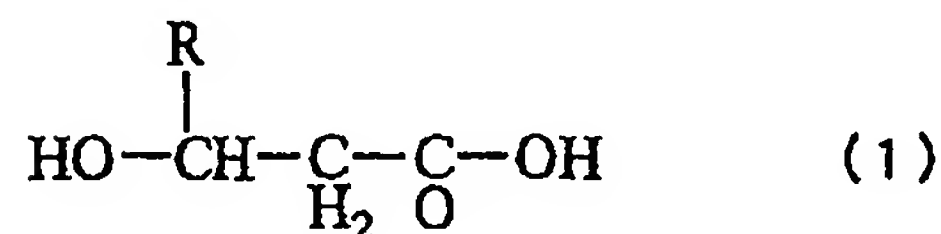
本発明により、生分解性かつ優れた物性を有する上記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合ポリエステルを、酵母を用いて生産することが可能となった。

## 請求の範囲

1. 酵母に、ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子からなる遺伝子発現カセットが一種類以上導入されてなることを特徴とする形質転換体。

5

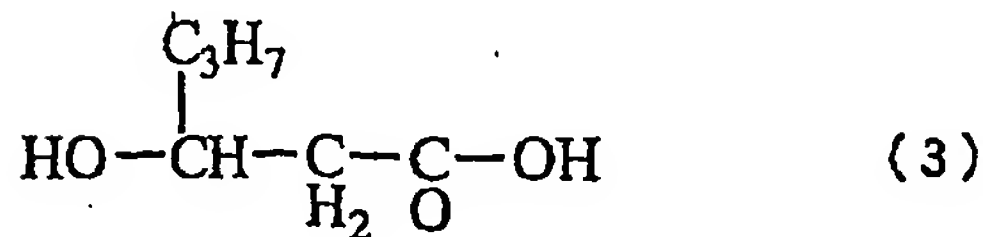
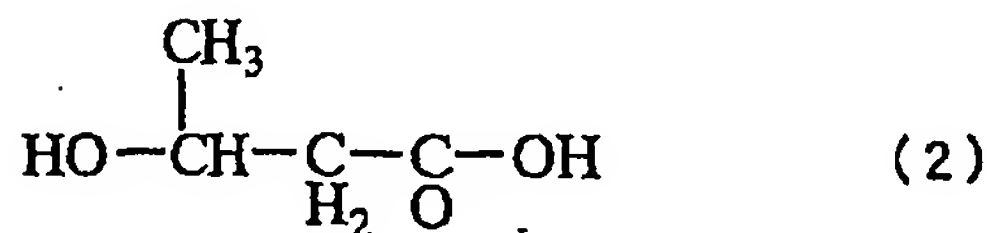
2. ポリエステルは、下記一般式(1)で示される3-ヒドロキシアルカン酸を共重合してなる共重合体である請求項1記載の形質転換体。



10 式中、Rは、アルキル基を表す。

3. ポリエステルは、下記式(2)で示される3-ヒドロキシ酪酸と下記式(3)で示される3-ヒドロキシヘキサン酸とを共重合してなる共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)である請求項1または2記載の形質転換体。

15



4. 酵母がアシクロコニディウム属、アンブロシオザイマ属、アルスロアスカス属、アルキシオザイマ属、アシュビア属、バブジェビア属、ベンシングトニア属、ボトリオアスカス属、ボトリオザイマ属、ブレッタノマイセス属、ビュレラ属、ビュレロマイセス属、キャンディダ属、シテロマイセス属、クラビスポラ属、クリプトコッカス属、シストフィロバシディウム属、デバリオマイセス属、デッカラ属、ディポダスコプシス属、ディポダスカス属、エニエラ属、エン

20

- ドマイコブセラ属, エレマスカス属, エレモセシウム属, エリスロバシディウム属, フェロマイセス属, フィロバシディウム属, ガラクトマイセス属, ゲオトリクム属, ガイラーモンデラ属, ハンセニアスポラ属, ハンセヌラ属, ハセガワエア属, ホルターマンニア属, ホルモアスカス属, ハイフォピキア属, イサット
- 5   ヘンキア属, クロエケラ属, クロエケラスポラ属, クルイベロマイセス属, コン  
ドア属, クライシア属, クルツマノマイセス属, ロイコスポリディウム属, リポ  
マイセス属, ロデロマイセス属, マラセジア属, メトシュニコウシア属, ムラキ  
ア属, マイクソザイマ属, ナドソニア属, ナカザワエア属, ネマトスポラ属, オ  
ガタエア属, オースポリディウム属, パチソレン属, ファチコスポラ属, ファフ  
10   ィア属, ピキア属, ロドスポリディウム属, ロドトルラ属, サッカロマイセス属,  
サッカロマイコーデス属, サッカロマイコブシス属, サイトエラ属, サカグチ  
ア属, サターノスポラ属, シゾブラストスポリオン属, シゾサッカロマイセス属,  
シュワニオマイセス属, スポリディオボラス属, スポロボロマイセス属, スポ  
ロパキデミア属, ステファノアスカス属, ステリグマトマイセス属, ステリグ  
15   マトスポリディウム属, シンビオタフリナ属, シンポディオマイセス属, シンポ  
ディオマイコブシス属, トルラスポラ属, トリコスポリエラ属, トリコスポロン  
属, トリゴノブシス属, ツチャエア属, ウデニオマイセス属, ワルトマイセス属,  
ウィカーハミア属, ウィカーハミエラ属, ウィリオブシス属, ヤマダザイマ属,  
ヤロウィア属, ザイゴアスカス属, ザイゴサッカロマイセス属, ザイゴウィリオ  
20   ブシス属又はザイゴザイマ属である請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の形質転  
換体。

5.   酵母がヤロウィア・リポリティカである請求項 1～4 のいずれか 1 項に記  
載の形質転換体。

25

6.   酵母がキャンディダ・マルトーサである請求項 1～4 記載のいずれか 1 項  
に記載の形質転換体。

7.   ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子発現カセットが、酵母で機能す

るプロモーター、ターミネーターからなる請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

8. プロモーター、ターミネーターがヤロウシア・リポリティカ由来である請求項 7 項に記載の形質転換体。

9. プロモーターがヤロウシア・リポリティカの ALK 3 由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

10 10. ターミネーターがヤロウシア・リポリティカの XPR 2 由来である請求項 7 又は 8 に記載の形質転換体。

11. プロモーター、ターミネーターがキャンディダ・マルトーサ由来である請求項 7 項に記載の形質転換体。

15

12. プロモーターがキャンディダ・マルトーサの ALK 1 由来である請求項 7 又は 11 に記載の形質転換体。

13. ターミネーターがキャンディダ・マルトーサの ALK 1 由来である請求項 7 又は 11 に記載の形質転換体。

20

14. ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子が、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) 由来の遺伝子である請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

25

15. ポリエステルの合成に関与する酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ由来の PHA 合成酵素遺伝子、または、PHA 合成酵素遺伝子および (R) 体特異的エノイル CoA ヒドラーゼ遺伝子である請求項 1～13 に記載の形質転換体。

16. 前記PHA合成酵素遺伝子は配列番号3に示す塩基配列からなり、(R)体特異的エノイルCoAヒドラーゼ遺伝子は配列番号4に示す塩基配列からなる請求項15に記載の形質転換体。

5 17. 請求項1～16記載のいずれか1項に記載の形質転換体を用いるポリエステルの製造方法であって、前記形質転換体を培養して得られる培養物から、ポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

18. 遺伝暗号CTGの少なくとも1つが、TTA、TTG、CTT、CTC、  
10 又はCTAに変換されていることを特徴とするポリエステルの合成に参与する酵素遺伝子。

19. 細菌由来の酵素をコードする請求項18記載のポリエステルの合成に参与する酵素遺伝子。

15

20. 前記細菌がアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) である請求項19記載のポリエステルの合成に参与する酵素遺伝子。

21. アエロモナス・キャビエ由来の酵素遺伝子がPHA合成酵素遺伝子又は  
20 (R)体特異的エノイルCoAヒドラーゼ遺伝子である請求項20に記載のポリエステルの合成に参与する酵素遺伝子。

22. 前記PHA合成酵素遺伝子が配列番号3に示す塩基配列からなる請求項21に記載のポリエステルの合成に参与する酵素遺伝子。

25

23. 前記(R)体特異的エノイルCoAヒドラーゼ遺伝子が配列番号4に示す塩基配列からなる請求項21に記載のポリエステルの合成に参与する酵素遺伝子。



図 1

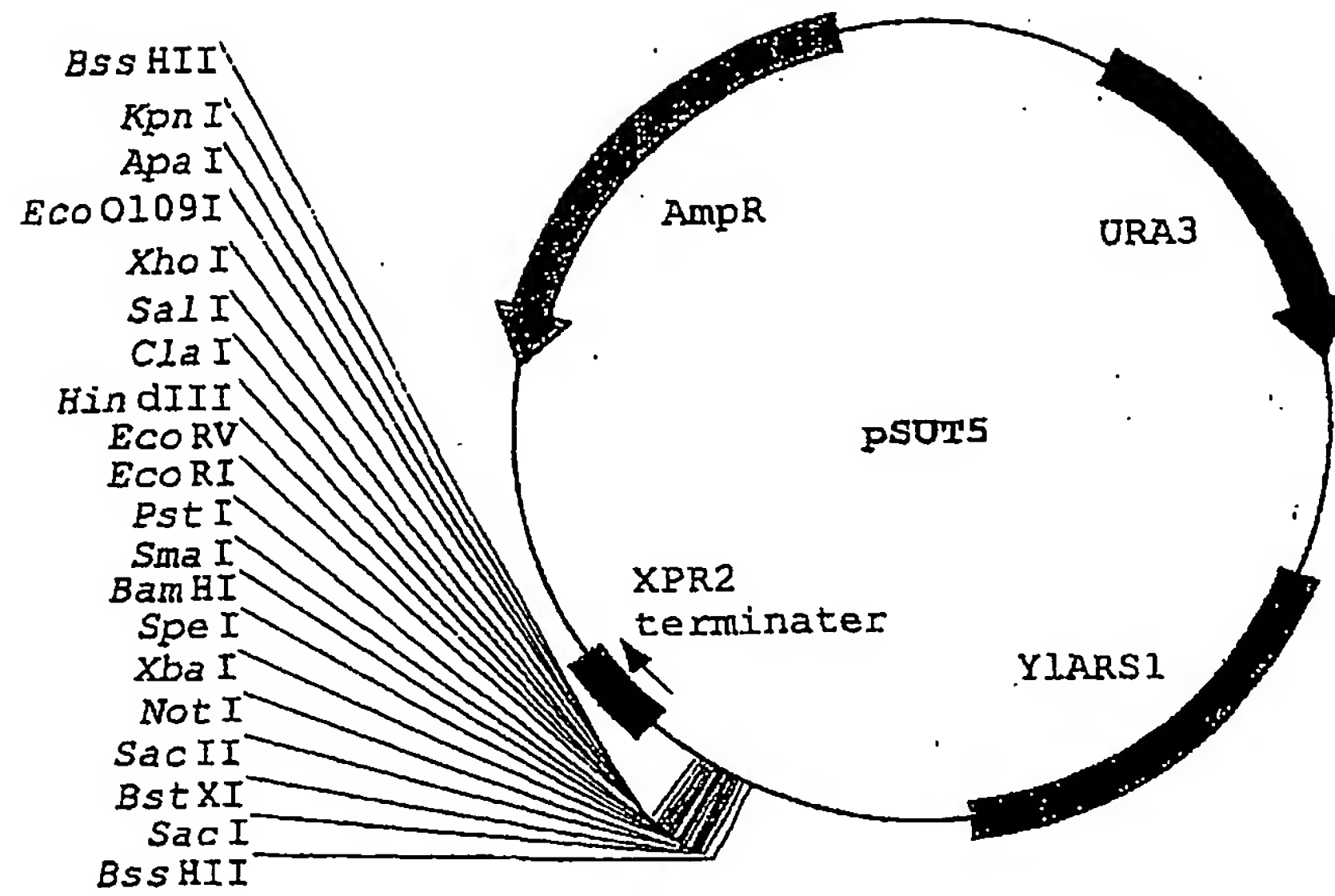


図 2

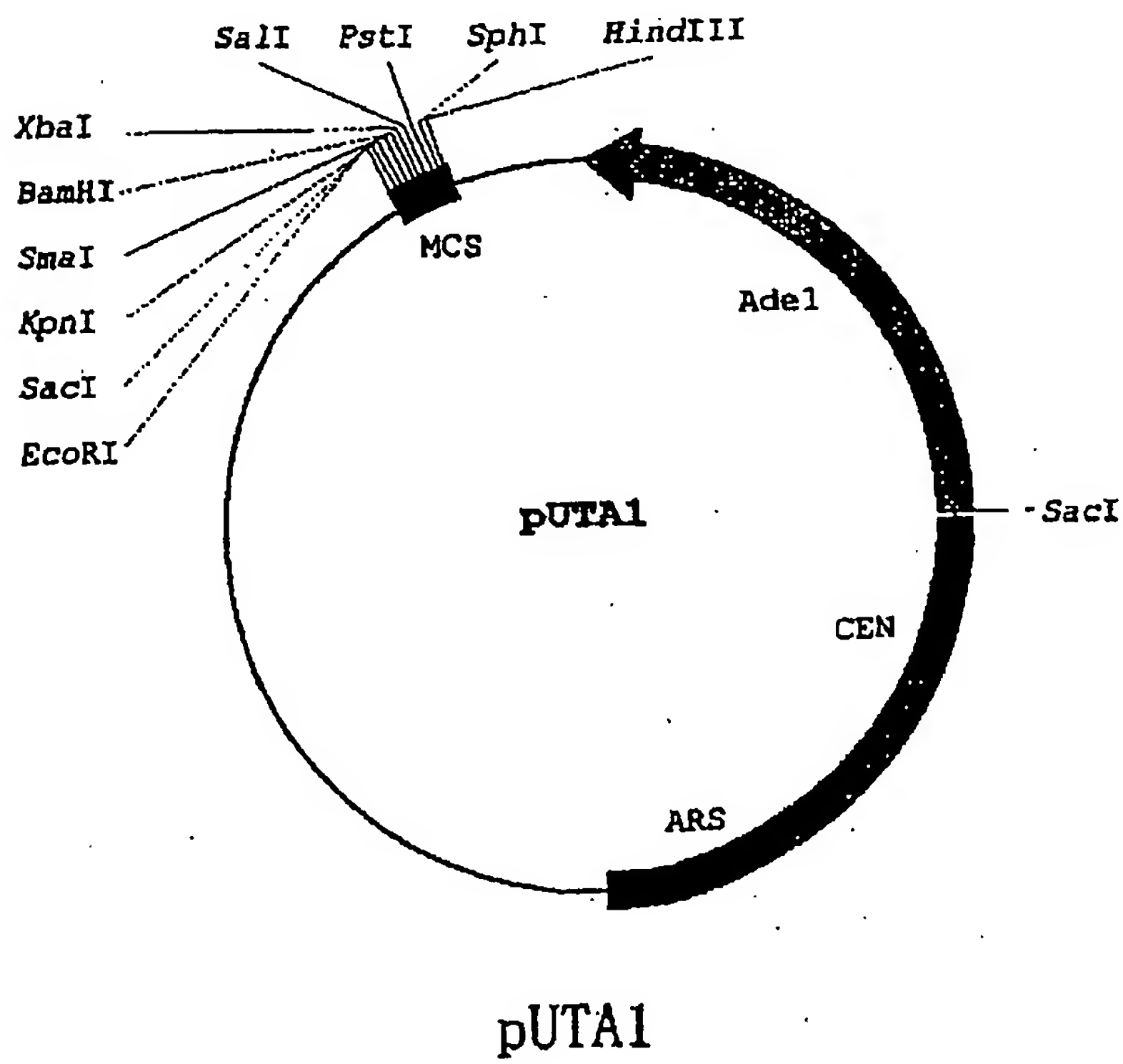


図 3

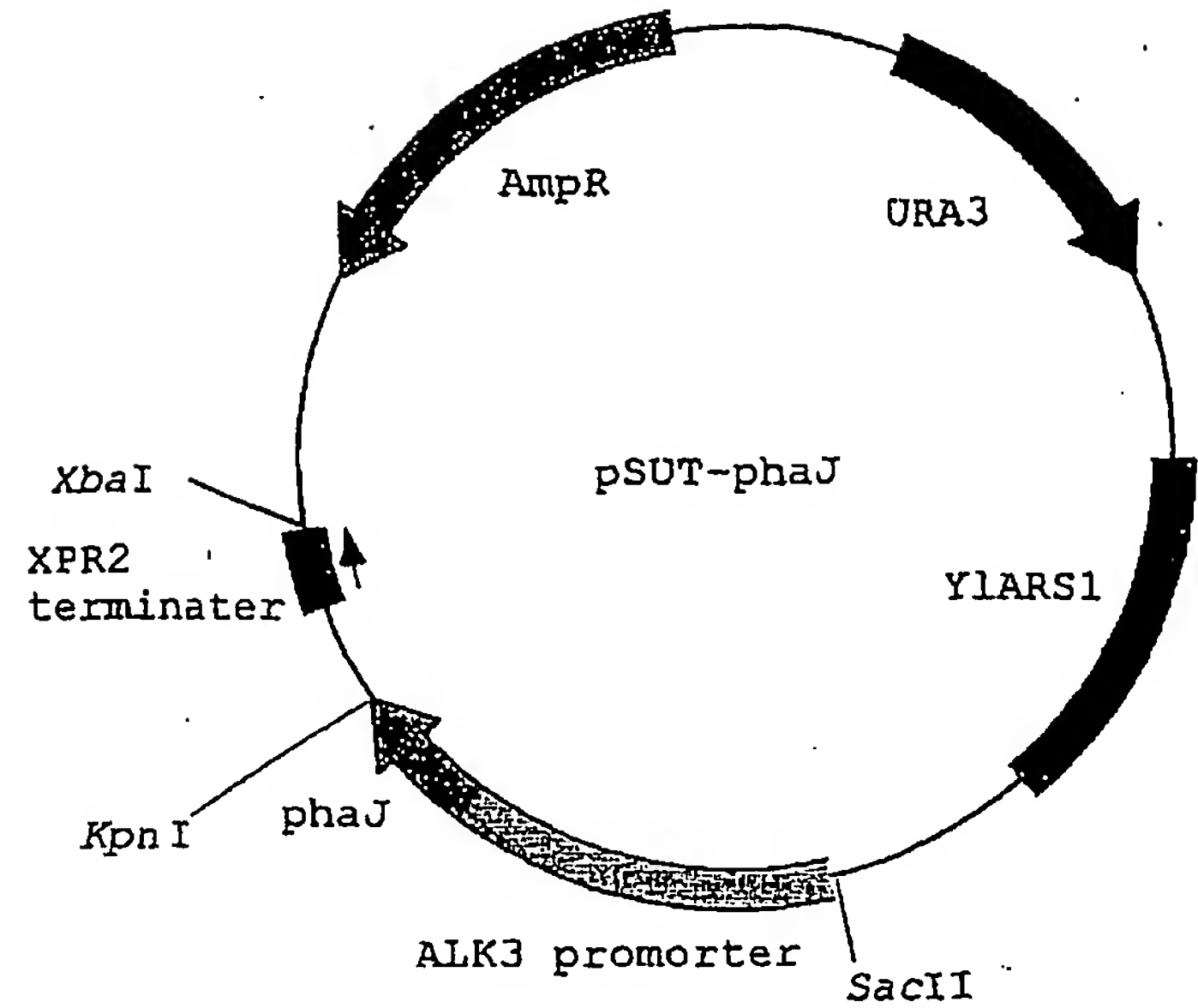
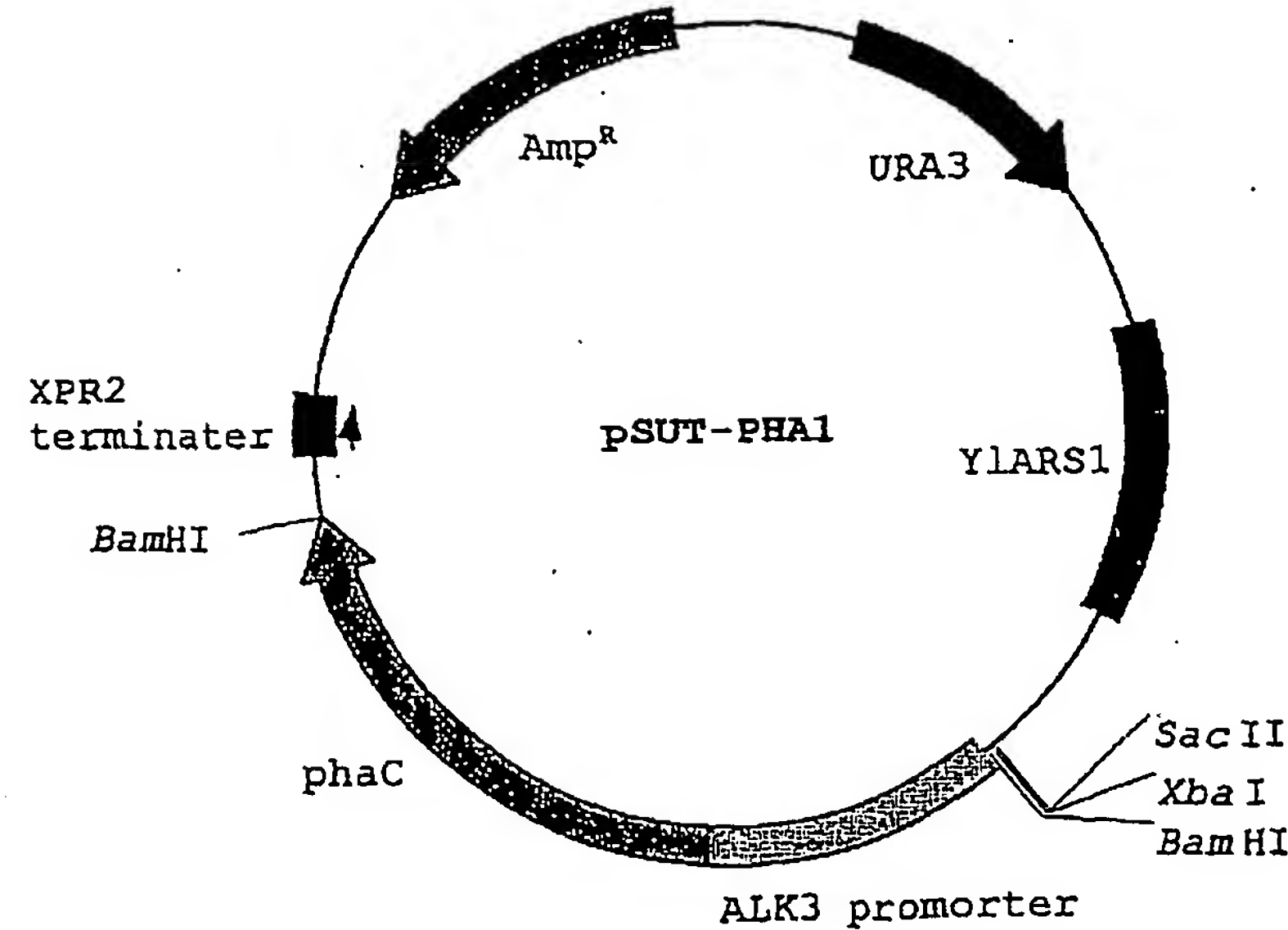


図 4



3/11

図 5

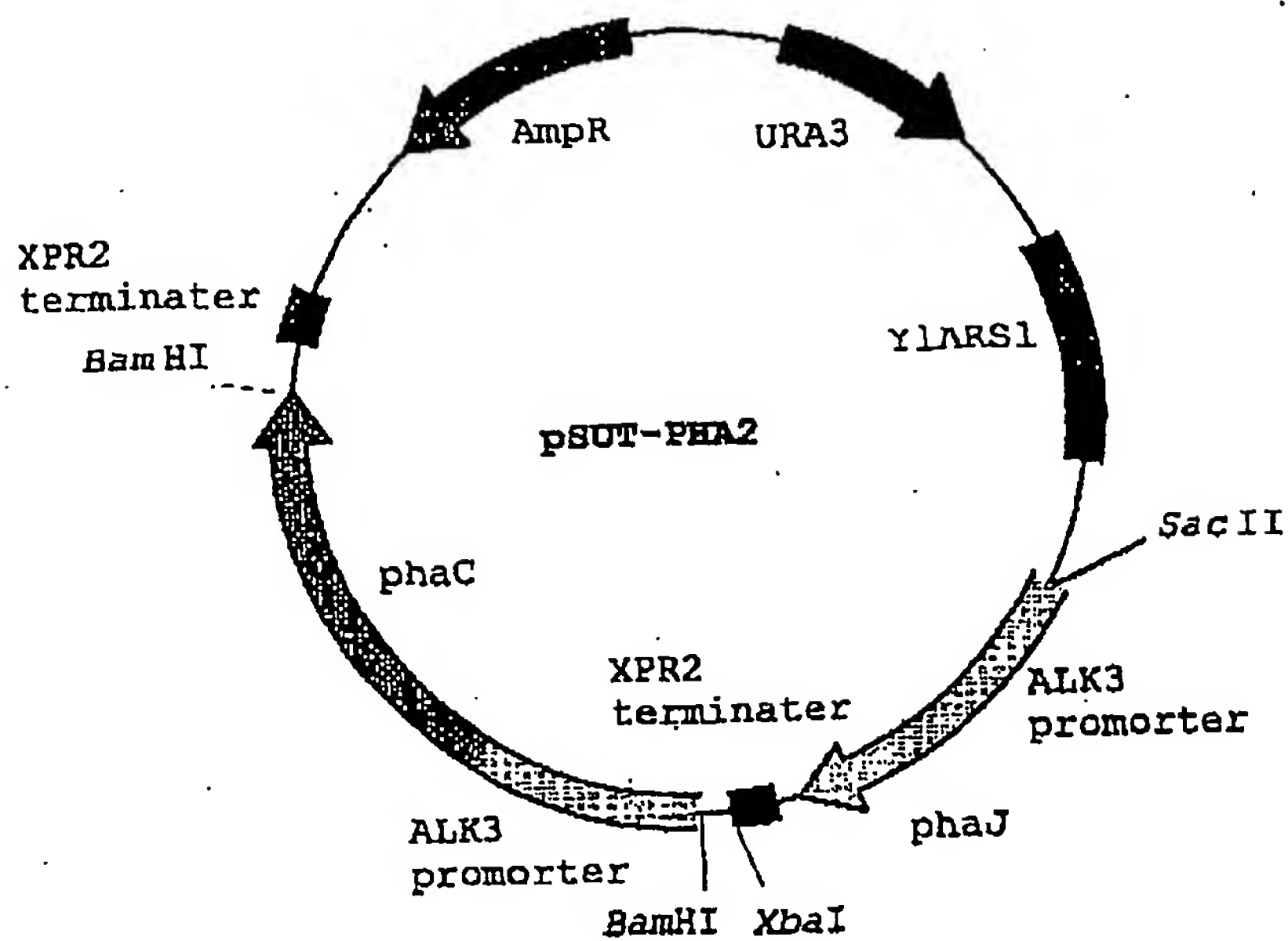
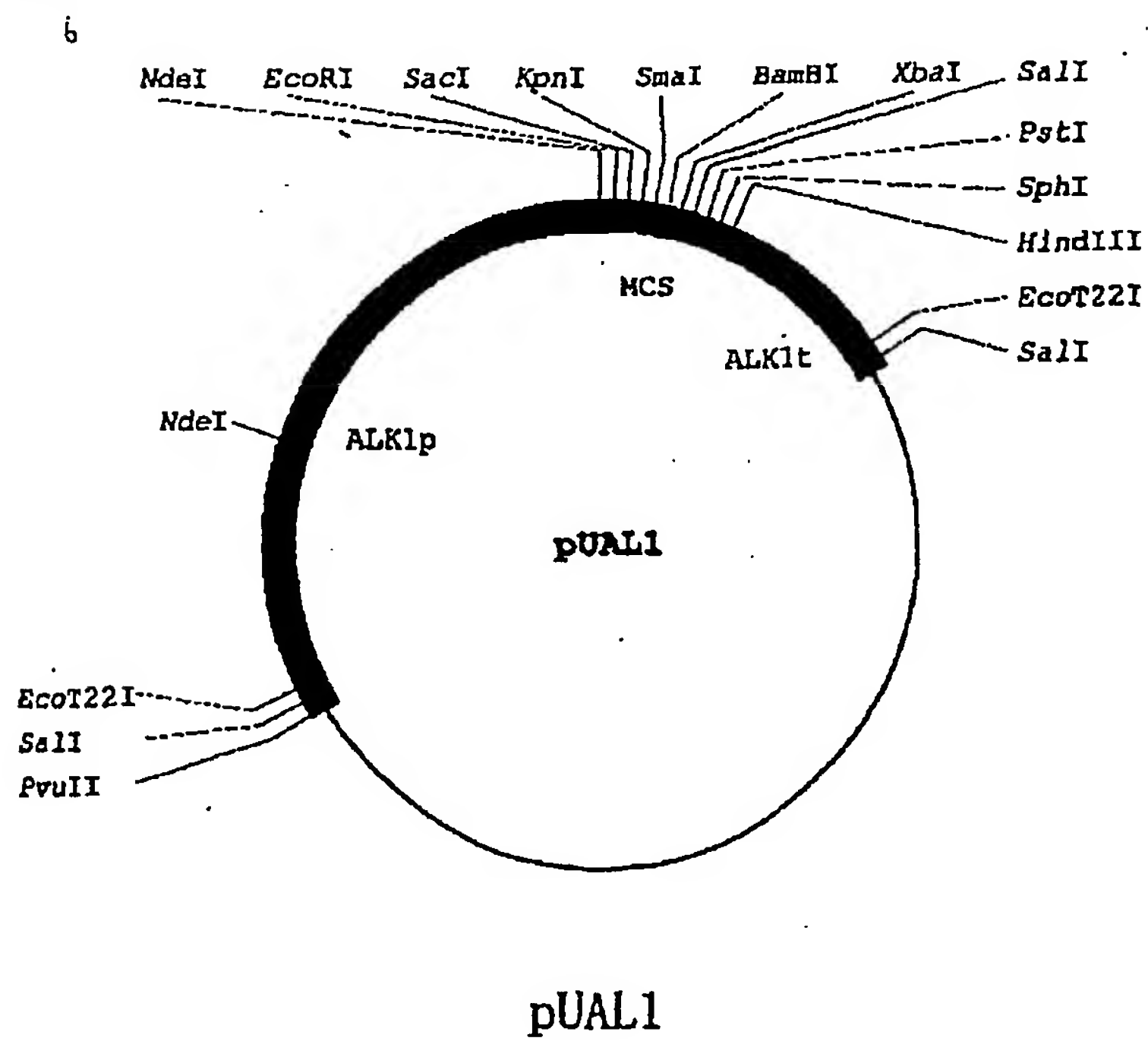
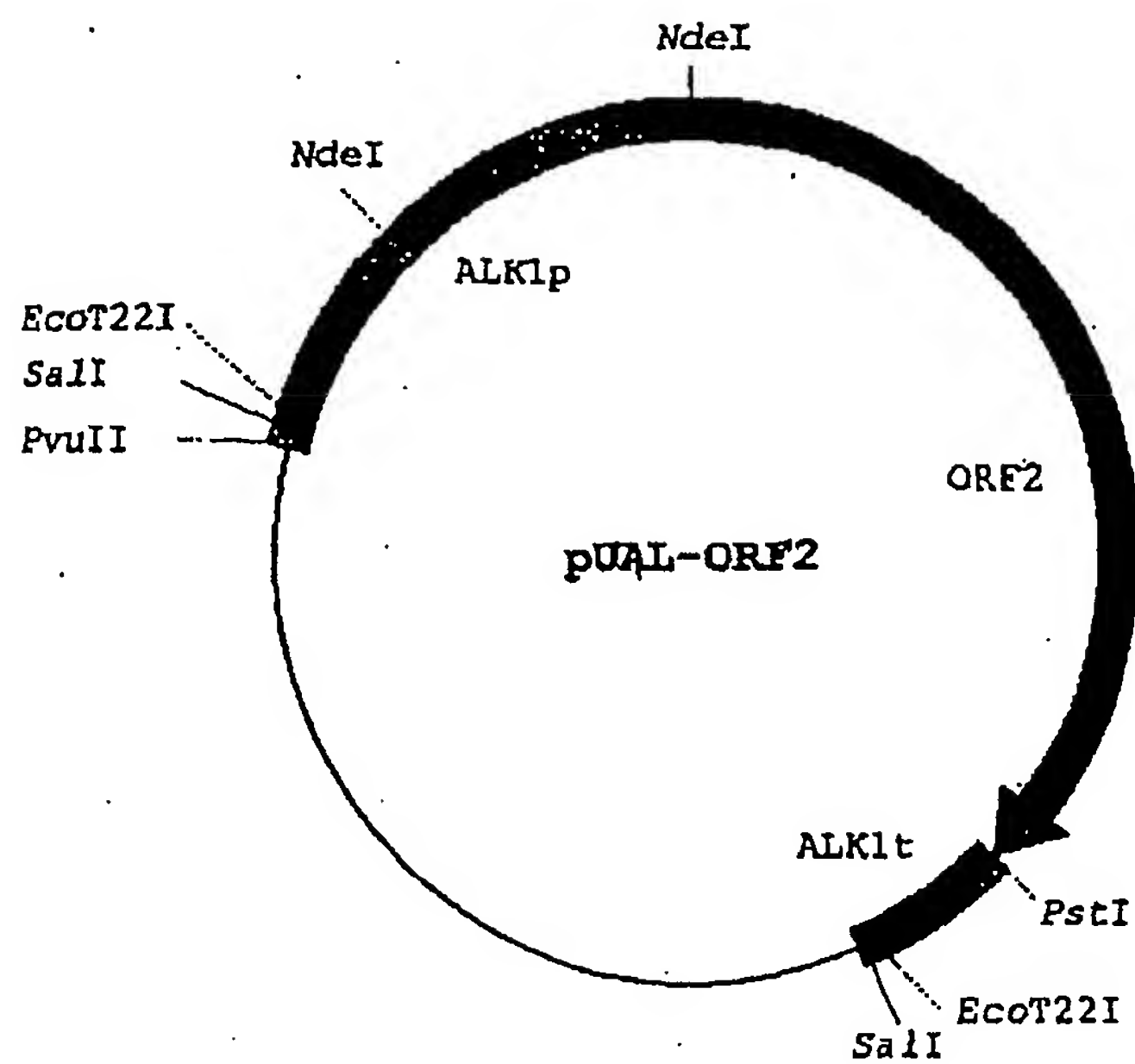


図 6



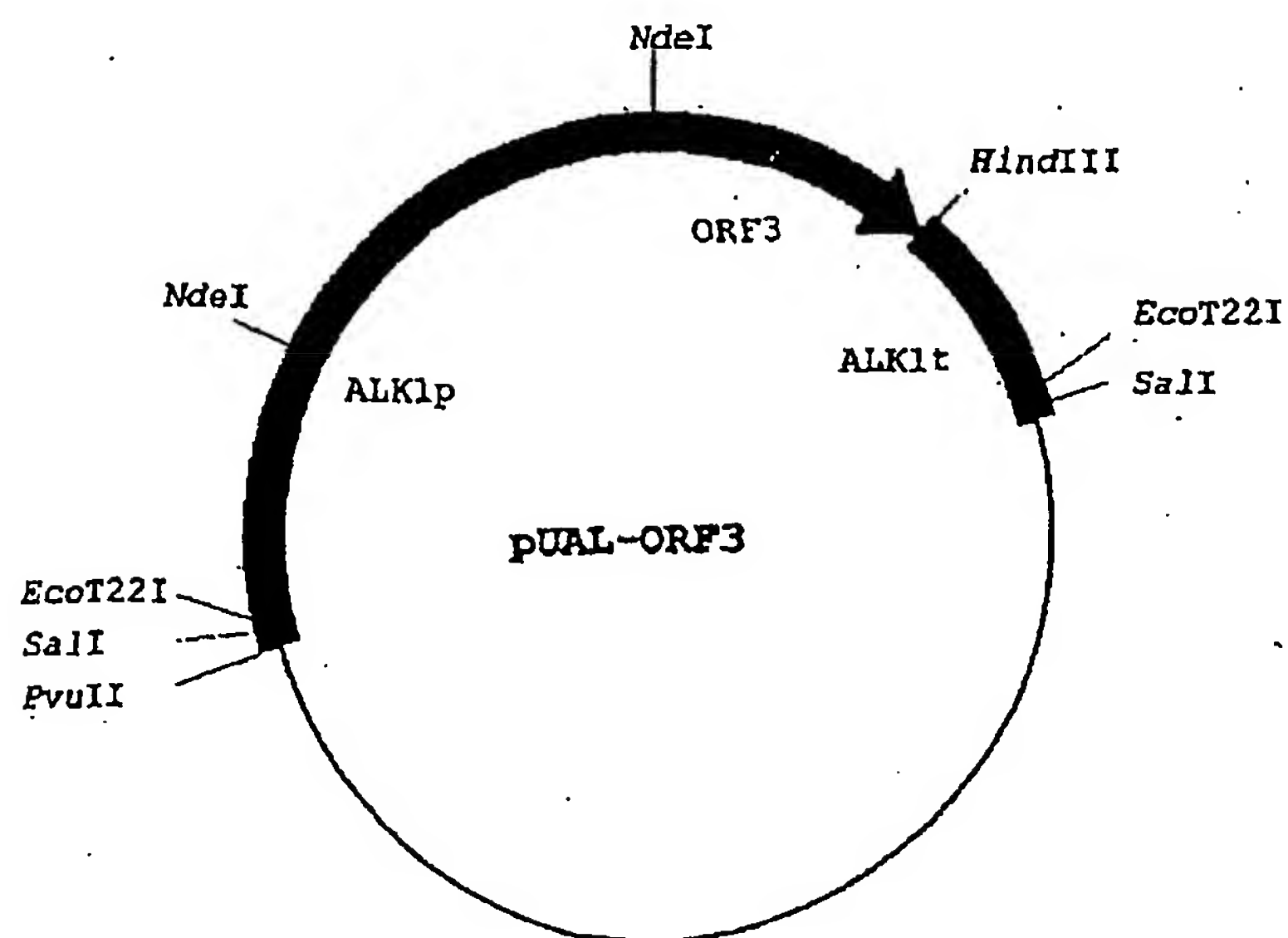
4/11

図 7



pUAL-ORF2

図 8



pUAL-ORF3

5/11

図 9

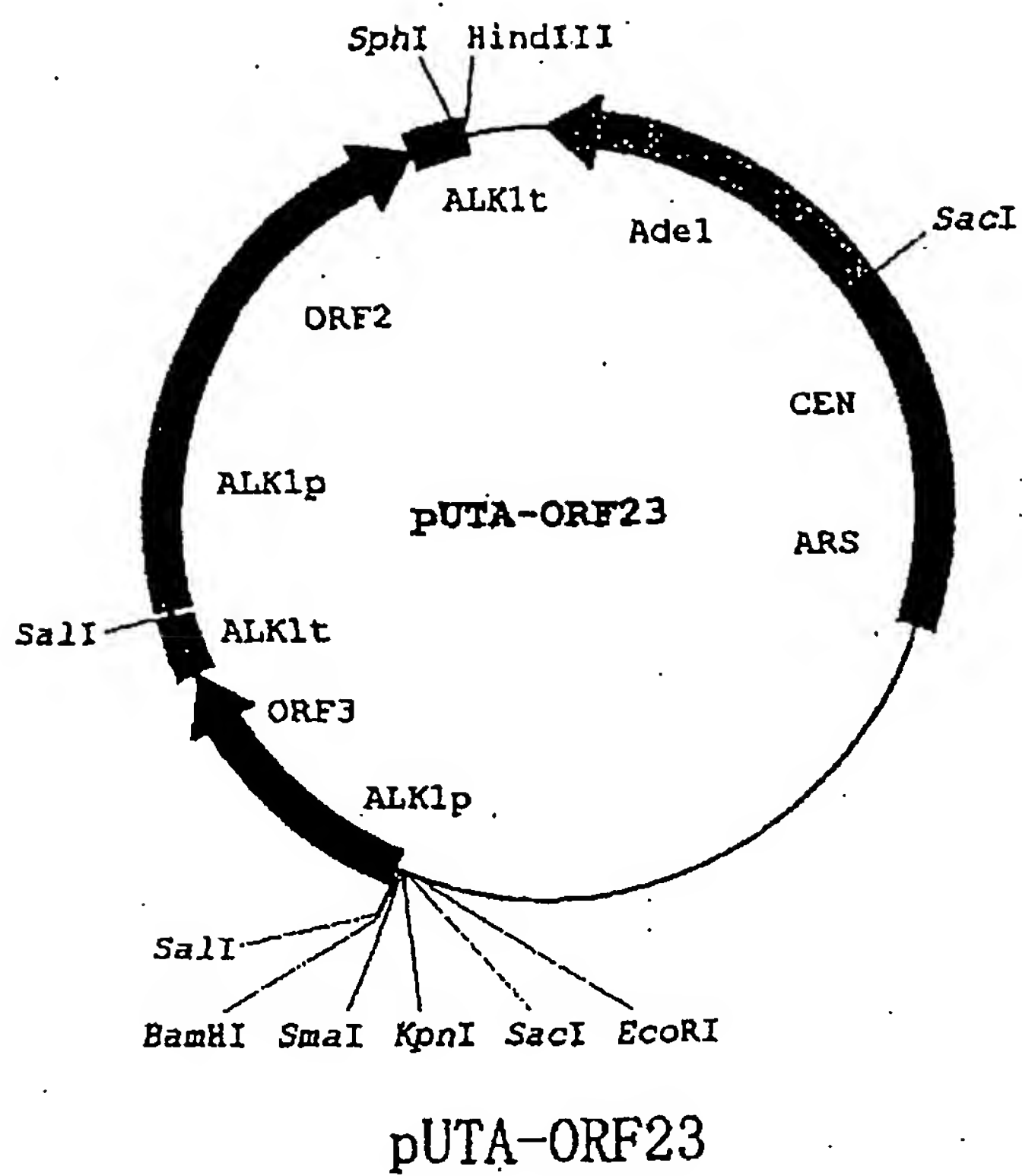
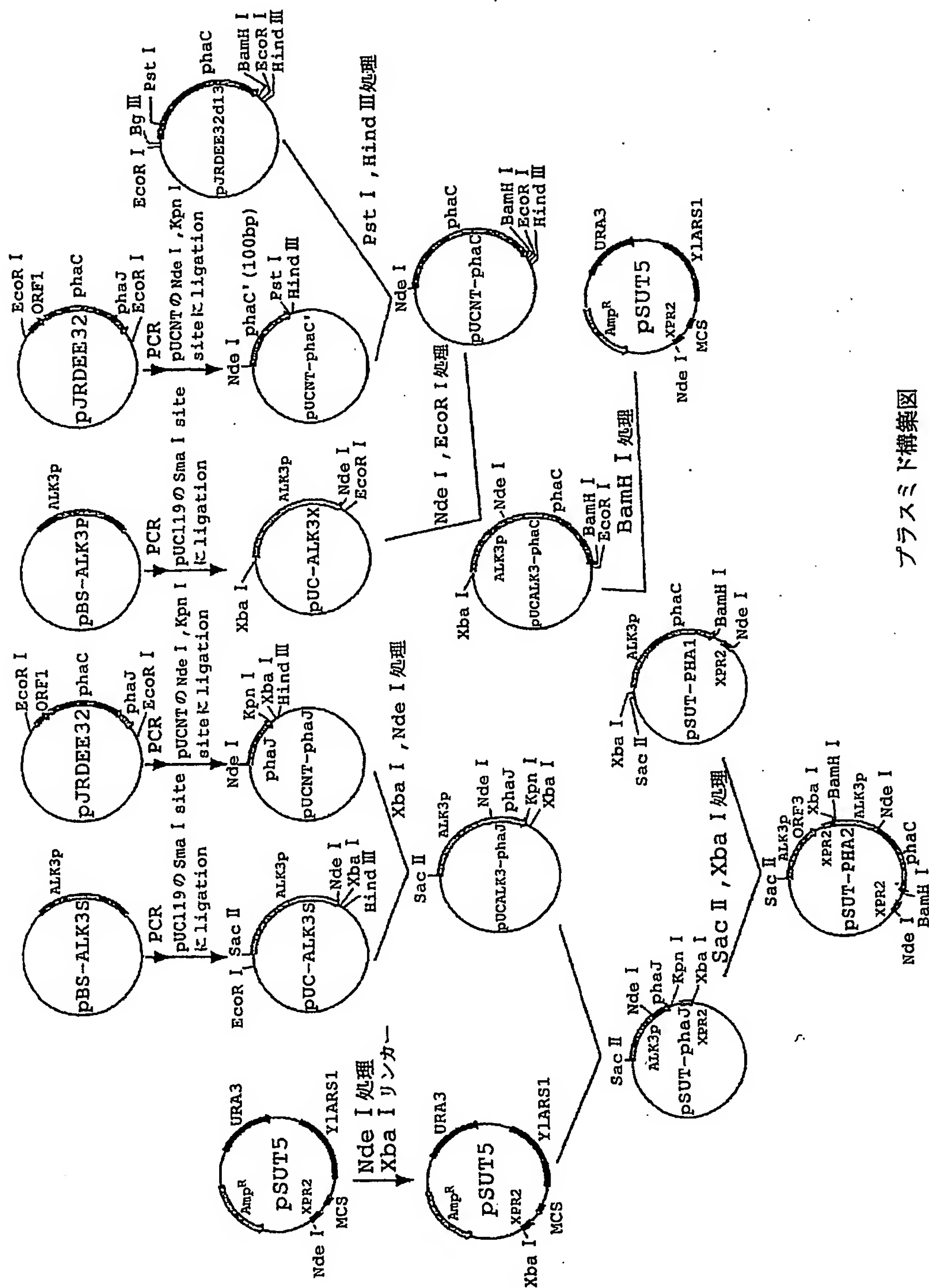


图 10

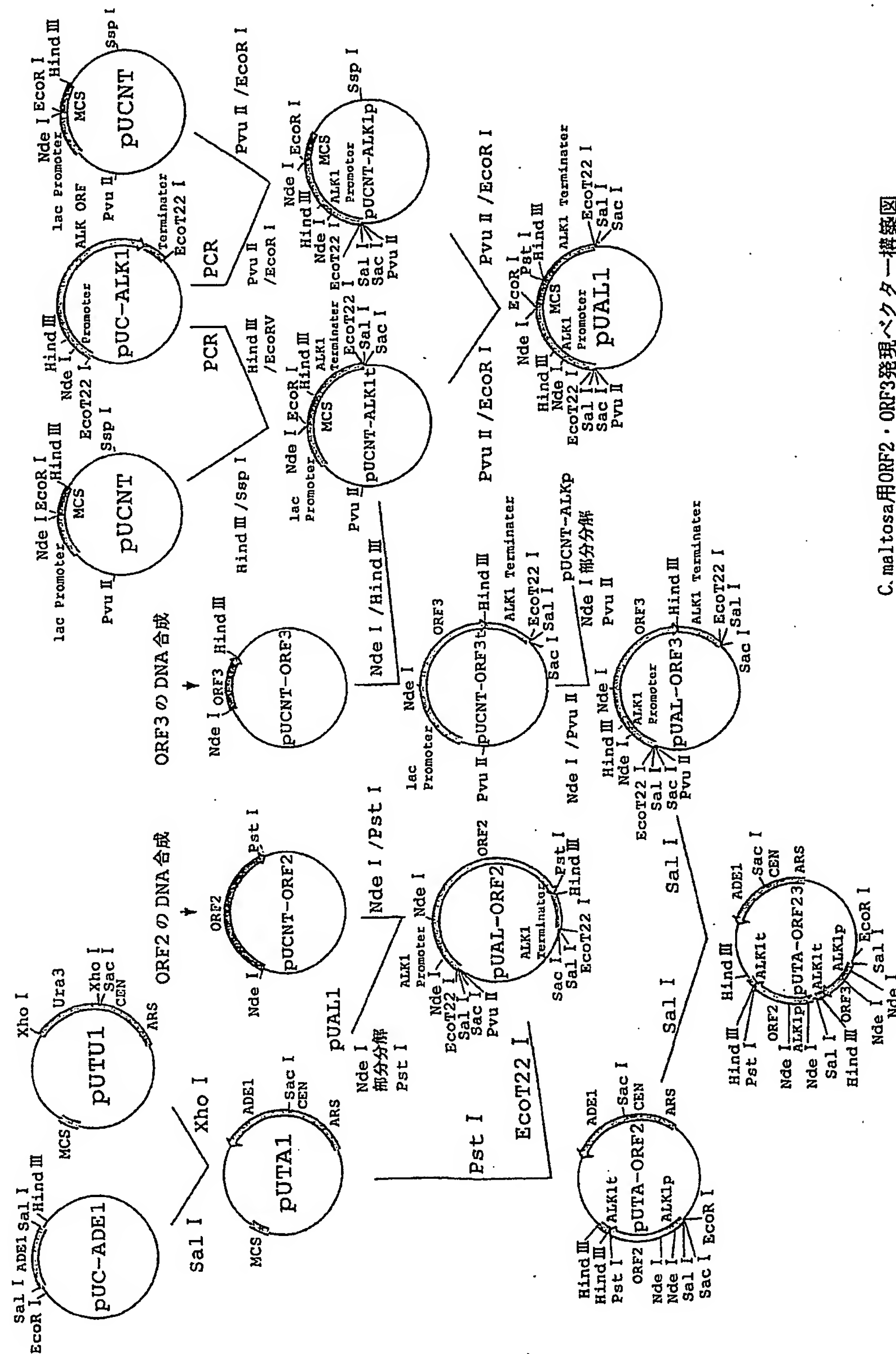


プラスミド構築図



7/11

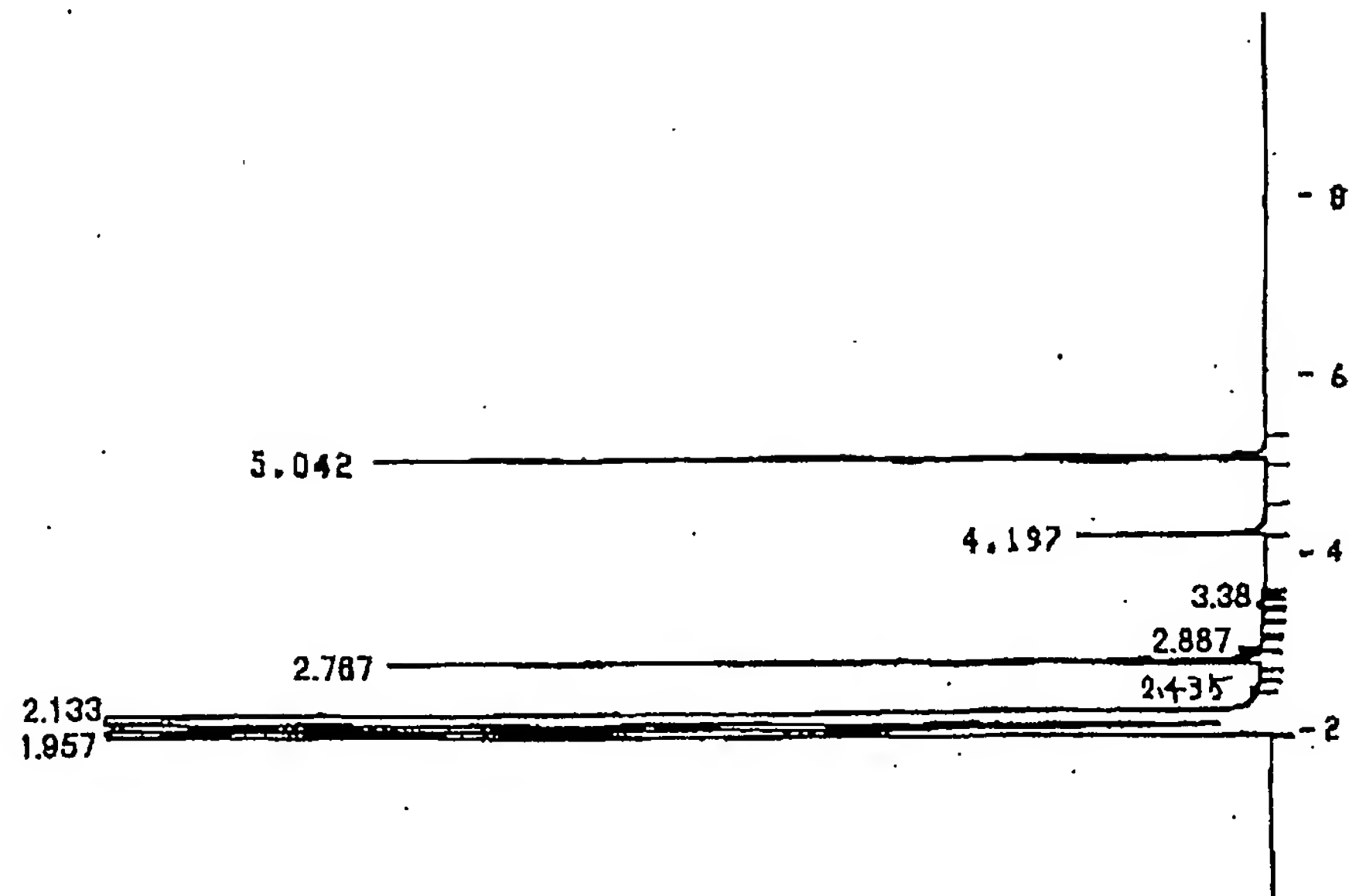
図 1 1



C. maltosa用ORF2・ORF3発現ベクター構築図

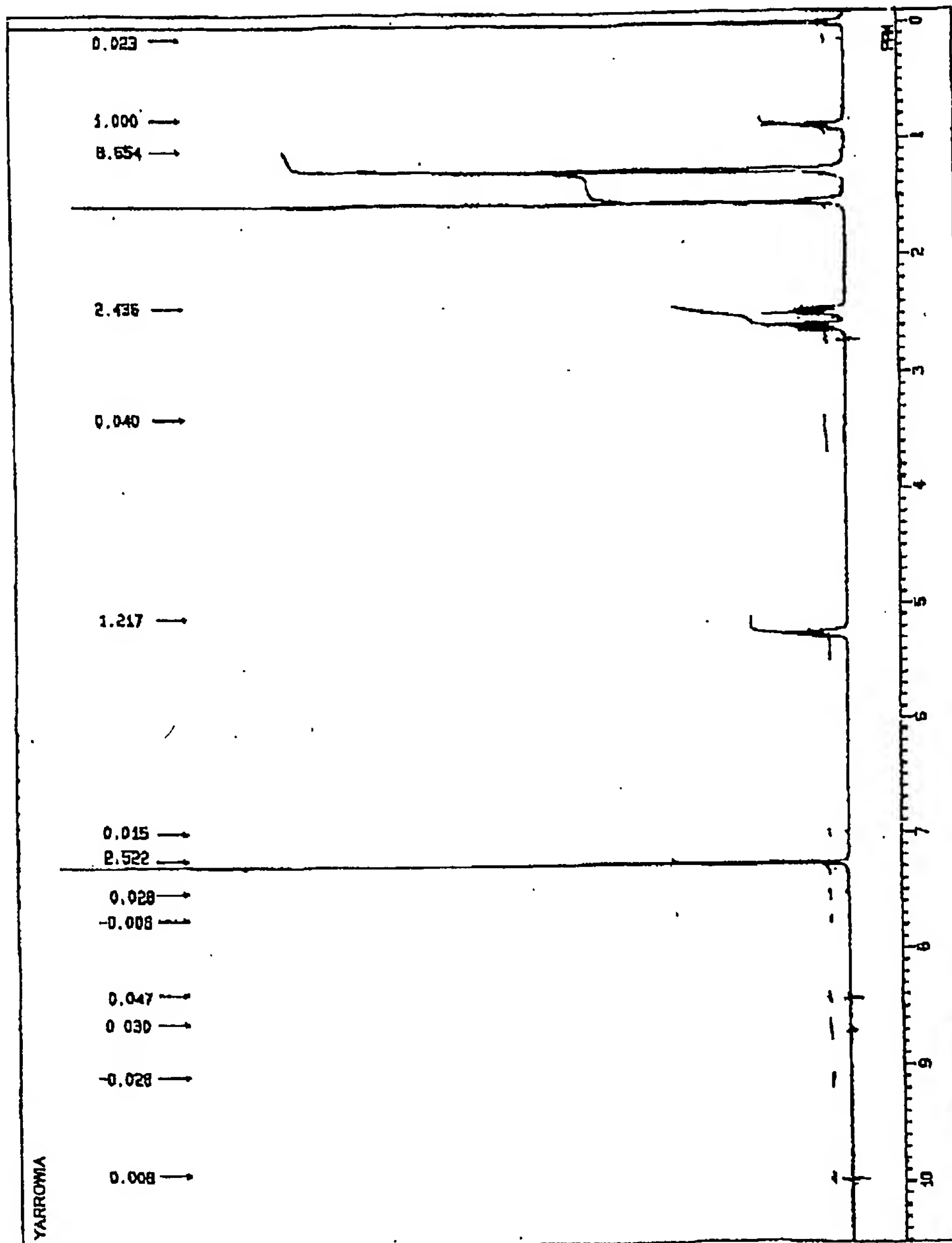
8/11

図 1 2



9/11

図 13



10/11

図 1 4

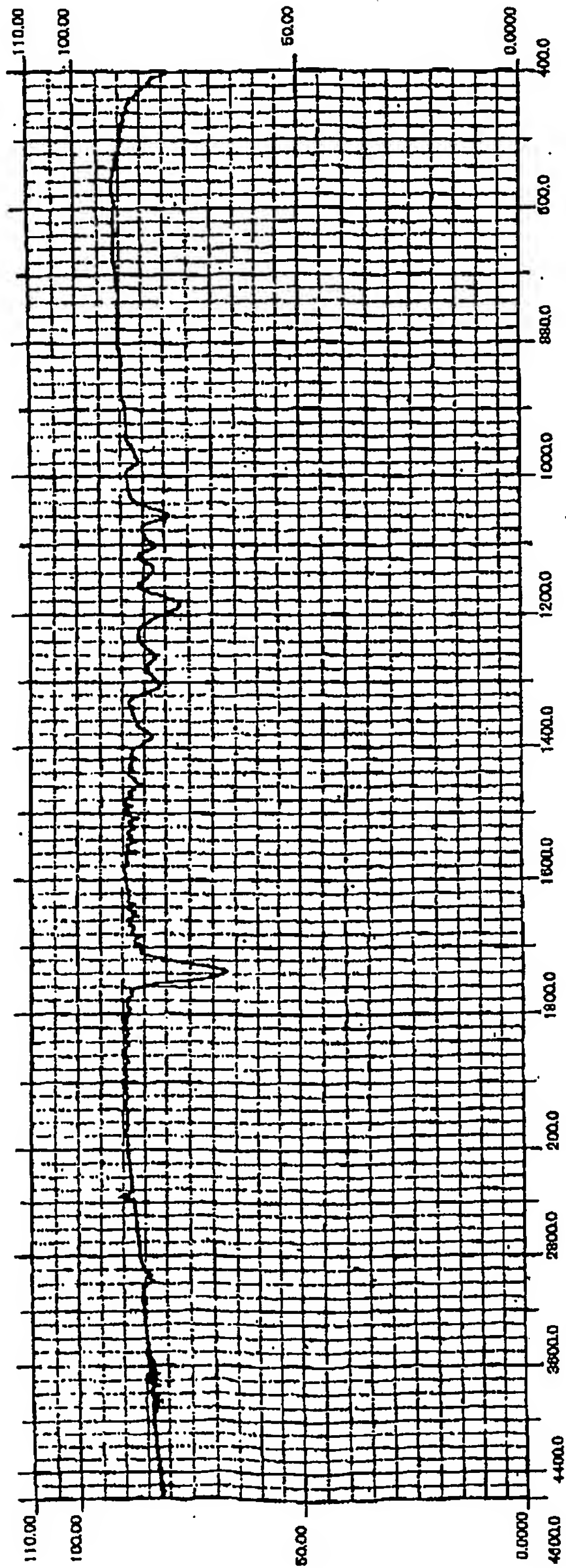
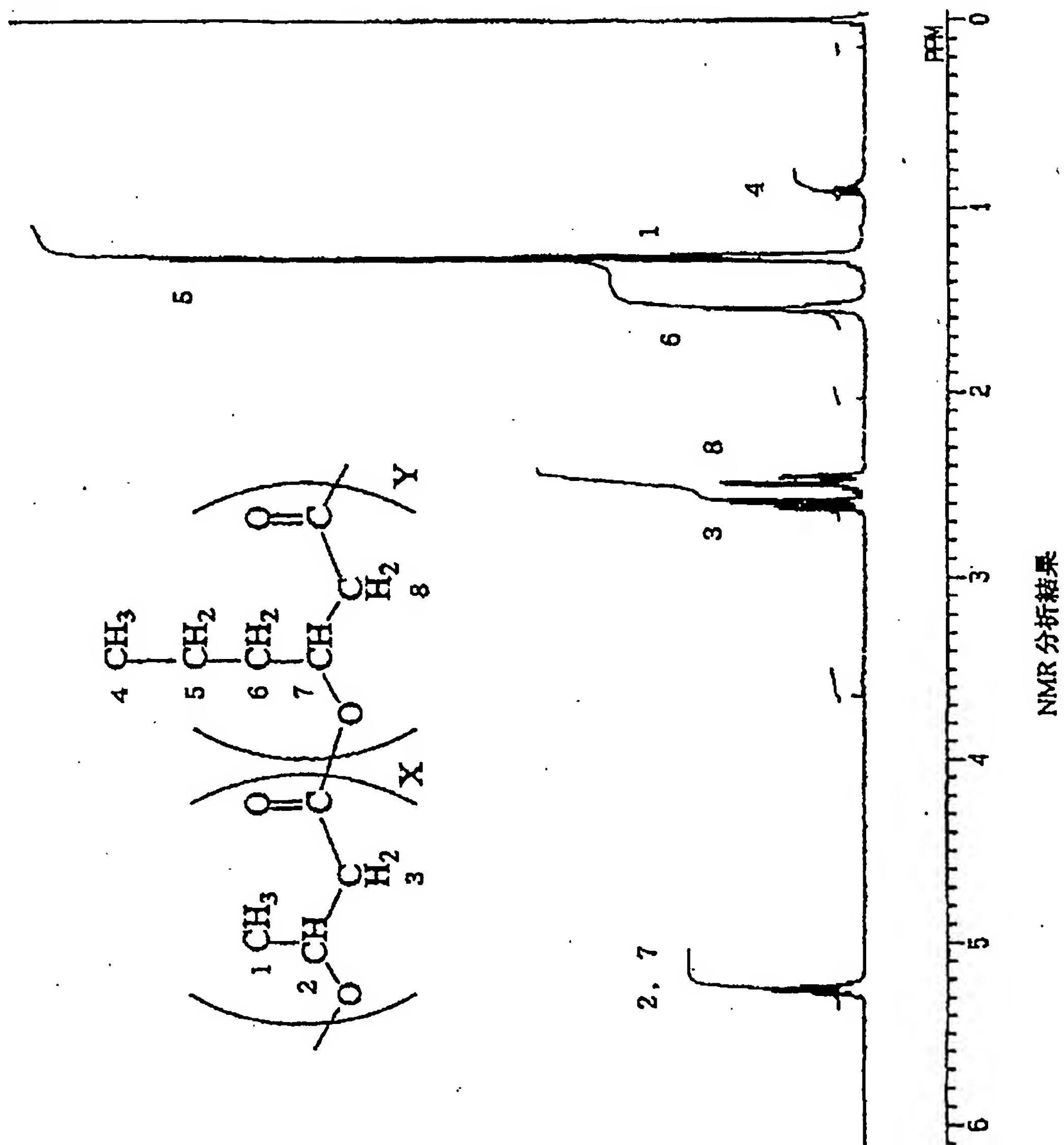


图 15



1/18

&lt;110&gt; 鐘淵化学工業株式会社 KANAKA CORPORATION

&lt;120&gt; 形質転換体及びそれを用いたポリエステルの製造方法

&lt;130&gt; T-618

&lt;160&gt; 21

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1785

&lt;212&gt; DNA

<213> *Aeromonas caviae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..1785

&lt;400&gt; 1

```
atg agc caa cca tct tat ggc ccg ctg ttc gag gcc ctg gcc cac tac      48
aat gac aag ctg ctg gcc atg gcc aag gcc cag aca gag cgc acc gcc      96
cag gcg ctg ctg cag acc aat ctg gac gat ctg ggc cag gtg ctg gag     144
cag ggc agc cag caa ccc tgg cag ctg atc cag gcc cag atg aac tgg     192
tgg cag gat cag ctc aag ctg atg cag cac acc ctg ctc aaa agc gca     240
ggc cag ccg agc gag ccg gtg atc acc ccg gag cgc agc gat cgc cgc     288
ttc aag gcc gag gcc tgg agc gaa caa ccc atc tat gac tac ctc aag     336
cag tcc tac ctg ctc acc gcc agg cac ctg ctg gcc tcg gtg gat gcc     384
ctg gag ggc gtc ccc cag aag agc cgg gag cgg ctg cgt ttc ttc acc     432
cgc cag tac gtc aac gcc atg gcc ccc agc aac ttc ctg gcc acc aac     480
ccc gag ctg ctc aag ctg acc ctg gag tcc gac ggc cag aac ctg gtg     528
```



2/18

cgc gga ctg gcc ctc ttg gcc gag gat ctg gag cgc agc gcc gat cag 576  
ctc aac atc cgc ctg acc gac gaa tcc gcc ttc gag ctc ggg cgg gat - 624  
ctg gcc ctg acc ccg ggc cgg gtg gtg cag cgc acc gag ctc tat gag 672  
ctc att cag tac agc ccg act acc gag acg gtg ggc aag aca cct gtg 720  
ctg ata gtg ccg ccc ttc atc aac aag tac tac atc atg gac atg cgg 768  
ccc cag aac tcc ctg gtc gcc tgg ctg gtc gcc cag ggc cag acg gta 816  
ttc atg atc tcc tgg cgc aac ccg ggc gtg gcc cag gcc caa atc gat 864  
ctc gac gac tac gtg gtg gat ggc gtc atc gcc gcc ctg gac ggc gtg 912  
gag gcg gcc acc ggc gag cgg gag gtg cac ggc atc ggc tac tgc atc 960  
ggc ggc acc gcc ctg tgc ctc gcc atg ggc tgg ctg gcg gcg cgg cgc 1008  
cag aag cag cgg gtg cgc acc gcc acc ctg ttc act acc ctg ctg gac 1056  
ttc tcc cag ccc ggg gag ctt ggc atc ttc atc cac gag ccc atc ata 1104  
gcg gcg ctc gag gcg caa aat gag gcc aag ggc atc atg gac ggg cgc 1152  
cag ctg gcg gtc tcc ttc agc ctg ctg cgg gag aac agc ctc tac tgg 1200  
aac tac tac atc gac agc tac ctc aag ggt cag agc ccg gtg gcc ttc 1248  
gat ctg ctg cac tgg aac agc gac agc acc aat gtg gcg ggc aag acc 1296  
cac aac agc ctg ctg cgc cgt ctc tac ctg gag aac cag ctg gtg aag 1344  
ggg gag ctc aag atc cgc aac acc cgc atc gat ctc ggc aag gtg aag 1392  
acc cct gtg ctg ctg gtg tgc gcg gtg gac gat cac atc gcc ctc tgg 1440  
cag ggc acc tgg cag ggc atg aag ctg ttt ggc ggg gag cag cgc ttc 1448  
ctc ctg gcg gag tcc ggc cac atc gcc ggc atc atc aac ccg ccg gcc 1536  
gcc aac aag tac ggc ttc tgg cac aac ggg gcc gag gcc gag agc ccg 1584  
gag agc tgg ctg gca ggg gcg acg cac cag ggc ggc tcc tgg tgg ccc 1632  
gag atg atg ggc ttt atc cag aac cgt gac gaa ggg tca gag ccc gtc 1680  
ccc gcg cgg gtc ccg gag gaa ggg ctg gcc ccc gcc ccc ggc cac tat 1728  
gtc aag gtg cgg ctc aac ccc gtg ttt gcc tgc cca aca gag gag gac 1776  
gcc gca tga 1785

3/18

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 405

&lt;212&gt; DNA

<213> *Aeromonas caviae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..402

&lt;400&gt; 2

atg agc gca caa tcc ctg gaa gta ggc cag aag gcc cgt ctc agc aag 48  
cgg ttc ggg gcg gcg gag gta gcc gcc ttc gcc gcg ctc tcg gag gac 96  
ttc aac ccc ctg cac ctg gac ccg gcc ttc gcc gcc acc acg gcg ttc 144  
gag cgg ccc ata gtc cac ggc atg ctg ctc gcc agc ctc ttc tcc ggg 192  
ctg ctg ggc cag cag ttg ccg ggc aag ggg agc atc tat ctg ggt caa 240  
agc ctc agc ttc aag ctg ccg gtc ttt gtc ggg gac gag gtg acg gcc 288  
gag gtg gag gtg acc gcc ctt cgc gag gac aag ccc atc gcc acc ctg 336  
acc acc cgc atc ttc acc caa ggc ggc gcc ctc gcc gtg acg ggg gaa 384  
gcc gtg gtc aag ctg cct taa 405

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;1785

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;CDS

&lt;222&gt;1..1785

4/18

&lt;400&gt;3

atg tct caa cca tct tat ggt cca ttg ttc gaa gct ttg gct cat tac 48  
aat gat aaa ttg ttg gct atg gct aaa gct caa acc gaa aga act gct 96  
caa gcc ttg ttg caa act aac ttg gat gat ttg ggt caa gtt ttg gaa 144  
caa ggt tct caa caa cca tgg caa ttg att caa gct caa atg aat tgg 192  
tgg caa gat caa tta aaa ttg atg caa cac act ttg tta aaa tct gct 240  
ggt caa cca tct gaa cca gtt att act cca gaa aga tct gat aga aga 288  
ttt aaa gct gaa gct tgg tct gaa caa cca att tat gat tac tta aaa 336  
caa tcc tat ttg tta act gct aga cat ttg ttg gct tct gtt gat gct 384  
ttg gaa ggt gtc cca caa aaa tct aga gaa aga ttg aga ttc ttt act 432  
aga caa tac gtc aac gct atg gct cca tct aat ttc ttg gct act aac 480  
cca gaa ttg tta aaa ttg act ttg gaa tcc gat ggt caa aat ttg gtt 528  
aga ggt ttg gct tta ttg gct gaa gat ttg gaa aga tct gct gat caa 576  
tta aac att aga ttg act gat gaa tcc gct ttt gaa tta ggt aga gat 624  
ttg gct ttg act cca ggt aga gtt gtt caa aga act gaa tta tat gaa 672  
tta att caa tac tct cca act act gaa acc gtt ggt aaa acc cca gtt 720  
ttg atc gtt cca cca ttc att aat aaa tat tac att atg gat atg aga 768  
cca caa aac tcc ttg gtc gct tgg ttg gtc gct caa ggt caa acc gtt 816  
ttc atg att tcc tgg aga aac cca ggt gtt gct caa gct caa att gat 864  
tta gat gat tat gtt gtt gat ggt gtc att gct gct ttg gat ggt gtt 912  
gaa gcc gct act ggt gaa aga gaa gtt cac ggt att ggt tac tgt att 960  
ggt ggt acc gct ttg tct tta gct atg ggt tgg ttg gcc gcc aga aga 1008  
caa aaa caa aga gtt aga act gct act ttg ttt act act ttg ttg gat 1056  
ttc tcc caa cca ggt gaa ttg ggt att ttt att cat gaa cca att atc 1104  
gcc gcc tta gaa gcc caa aat gaa gct aaa ggt att atg gat ggt aga 1152  
caa ttg gcc gtc tcc ttc tct ttg ttg aga gaa aac tct tta tat tgg 1200  
aat tac tat att gat tct tac tta aaa ggt caa tct cca gtt gct ttt 1248  
gat ttg ttg cac tgg aac tct gat tct act aat gtt gcc ggt aaa act 1296  
cat aac tct ttg ttg aga aga tta tat ttg gaa aat caa ttg gtt aaa 1344

5/18

ggt gaa tta aaa att aga aac act aga att gat tta ggt aaa gtt aaa 1392  
act cca gtt ttg ttg gtt tct gcc gtt gat gat cac att gct tta tgg 1440  
caa ggt acc tgg caa ggt atg aaa ttg ttc ggt ggt gaa caa aga ttt 1488  
tta ttg gcc gaa tcc ggt cat att gct ggt att att aat cca cca gct 1536  
gct aac aaa tac ggt ttc tgg cac aat ggt gct gaa gct gaa tct cca 1584  
gaa tct tgg ttg gct ggt gcc acc cat caa ggt ggt tcc tgg tgg cca 1632  
gaa atg atg ggt ttt att caa aac aga gat gaa ggt tct gaa cca gtc 1680  
cca gcc aga gtc cca gaa gaa ggt ttg gct cca gct cca ggt cac tat 1728  
gtc aaa gtt aga tta aac cca gtt ttc gct tgt cca acc gaa gaa gat 1776  
gct gct taa 1785

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;405

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;CDS

&lt;222&gt;1..405

&lt;400&gt; 4

atg tct gct caa tcc ttg gaa gtt ggt caa aaa gct aga tta tct aaa 48  
aga ttc ggt gcc gcc gaa gtt gct gct ttt gct gcc tta tct gaa gat 96  
ttc aac cca ttg cac ttg gat cca gct ttt gct gct act acc gcc ttc 144  
gaa aga cca atc gtc cat ggt atg ttg tta gct tct tta ttt tcc ggt 192  
ttg ttg ggt caa caa ttg cca ggt aaa ggt tct att tat ttg ggt caa 240  
tct tta tct ttc aaa ttg cca gtc ttt gtc ggt gat gaa gtt acc gct 288  
gaa gtt gaa gtt act gct ttg aga gaa gat aaa cca att gct act ttg 336  
act act aga att ttc act caa ggt ggt gct tta gct gtt acc ggt gaa 384

6/18

gct gtt gtc aaa ttg cca taa

405

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1036

&lt;212&gt; DNA

<213> *Yarrowia lipolytica*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; promoter ALK3p

&lt;400&gt; 5

ctgcagcggc gagaccggtt ctgggccgac tacgacgtgc ctggagggac gctccgggag 60  
aatctctttg gacggggcaa gatctcccc gaccaccctg cgggacagta caagtgggaa 120  
gagggggagt ttcccttgac caagagtgc aagagtgaga acggcaatgg agtcaatgga 180  
gatgagcccg ctactaagaa aaaaaaatc tgaacaagag ccggttttag tacgatacaa 240  
gagccggtac gtggacatgc agctgctttt cgaacatgaa gggagcacga cccacgtat 300  
cagtattatg caagggacca gaagtggcct cggcaaaaga ttggcctcgg tcaacaaaag 360  
gtcatcatat ccgtctccgc atccgtctgt acgtgaatta tgttacttgt atctttactg 420  
tactggtttg gagctacgtc gccaaactaat gccaacacgt cctgtggtgt gtctataggt 480  
atgtaataca agtacgagta aatgtattgt actggtgcag cacagtagat gacggagacg 540  
atgaatcggg caccaccac aaacattgcc tcaaacacc gttatattgt ctactgtcg 600  
tggctgagac agactcctcg gggccttgta agaggggggaa tgttgagac agatgccac 660  
aagtgacat gcatttttg gggcaggaga aaaaccaatg ttgtgggga tagaacecat 720  
caaatgaatc taaatgaact ctccaaaat gaaccactct ctctctcaa tcaaagccct 780  
gcgaaatgtc ctccgtctgt ttctcggacc cttagccgta cgacgccata ttacgatagc 840  
ccgccacctt aatgcgttta acttgcattgc atgcgtctgc atacagctgc atctgtcata 900  
tatgcacat ttccccacac aactgaagtt tatatatata tactgtaagg actcctgaag 960  
tggcacgaac acacctgatc acagcaacat tacagtacac tactctgctc gtattttaca 1020  
atactggacg aaaatg 1036

7/18

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;1017

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Candida maltosa

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;promoter ALK1p

&lt;400&gt;6

atgcatgaac aggattaat cccaagaaaa aagtctattt tctattttca caaggaaact 60  
ggaaaaacct ttttgtgtt tgaagtagct ccgtaataac ctgtaaaaaa ataaattttg 120  
aagatttgac ttgctgatga aaatgctatc agtgtagctc tagacttgat actagactat 180  
gatggcaaca catggtggtc aacgtgcaag acatcaccca atgagaagac tgctaaccag 240  
aaaaaaaaagg ggacaaaaga aaaactcgag agaaaaagtc aaattggtgt aaaattggct 300  
attttggtta ctttctaata ggggaaatta attgtttaa attccagttt ttccagagtt 360  
aagatttga ccaattattt ttaatccata tgatcttcat cattatcaac ttgtgaaaaa 420  
taataatcga ggtacgttta atacgagata ttagtctacg gctatgaatg ttggatatac 480  
ttcattgacg atcagaagct tgattggtta ttcagggtga tgtgtggata taaacccaac 540  
aaattatcta gcaactgtgc ctccccaca ttggtcaaag aaaccctaaa gcaaattaa 600  
atctggataa ataatcatt catttcacat ttccggtta gtataagggt tttaaattt 660  
tttttacag tttagccctt tcaattacca aatacggtaa caatgtgctt tgaacatgc 720  
aggggatttt ctccgttgct gtttctcca catgcttta atgtgtaata aattaaaaaa 780  
attacaaaga aaaaccggca tataagcatc ggagtttaca ttgttaacta actgcaaaat 840  
ggcgaatgtt caaatcaaca aaatttaaaa aaaccccaaa aaaaaagtat catataaatt 900  
aaactcaaaa tccttttgat tgcataaaat tttaaatct cttctttttt ttcttttta 960  
ctttctatc tattctattc ttttttata tatctaattc attataaca tctgggtc 1017

&lt;210&gt;7



8/18

&lt;211&gt;218

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Candida maltosa

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;terminater ALK1t

&lt;400&gt;7

atagatggat ttttctttt tatgtgtatt tccgggtaat aaatgtttaa atttttttt 60  
taataaaaat attttagtt atttatatgc aaaaaaaaaa aatattcaaa gcaatcttcc 120  
tttctttctt tatctttccc ccatgctaag gtctaaaaca ccacaactta aaaccaact 180  
taaccgtata atactaagat caatctccaa agatgcat 218

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 8

gctctagact gcagcggcga gaccggttct gg 32

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

9/18

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 9

ggacacatat gcgtccagta ttgtaaaata cgagc

35

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 10

tccccgcggc tgcagcggcg agaccgggtc tgg

33

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 11

ggacacatat gagccaacca tttatggcc c

31

&lt;210&gt; 12

10/18

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 12

cccagatcgt ccagattggt ctgcag

26

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 13

ggacacatat gagcgcaaa tccctggaag t

31

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

11/18

&lt;400&gt; 14

ggggtacctt aaggcagctt gaccacggc

29

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt;46

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;primer

&lt;400&gt;15

ttttcagct ggagctcgtc gacatgcatg aacaggattt aatccc

46

&lt;210&gt;16

&lt;211&gt;39

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;primer

&lt;400&gt;16

ccggaattcc atatgcagat gttataaatg aattagata

39

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;32

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

12/18

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;primer

&lt;400&gt;17

cggaagctta tagatggatt tttctttttt at

32

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;45

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;primer

&lt;400&gt;18

ttttgatatc gagctcgtcg acatgcatct ttggagattg atctt

45

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 5804

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; E.coli, Yarrowia lipolytica

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; plasmid pSUT5

&lt;400&gt; 19

aggccattct cgttactgcc aaaacaccac ggtaatcggc cagacaccat ggacgagtat 60

13/18

ctgtctgact cgtcattgcc gcctttggag tacgactcca actatgagtg tgcttggatc 120  
actttgaoga tacattcttc gttggaggct gtgggtctga cagctgcgtt ttcggcgcgg 180  
ttggccgaca acaatatcag ctgcaacgtc attgctggct ttcattcatga tcacattttt 240  
gtcggcaaag gcgacgcca gagagccatt gacgttcttt ctaatttga ccatagccg 300  
tatagtccag tctatctata agttcaacta actcgtaact attaccataa catatacttc 360  
actgccccag ataaggttcc gataaaaagt tctgcagact aaatttattt cagtctcttc 420  
ttcaccacca aaatgccttc ctacgaagct cgagctaacg tccacaagtc cgcctttgcc 480  
gctcgagtgc tcaagctcgt ggcagccaag aaaaccaacc tgtgtgcttc tctggatgtt 540  
accaccacca aggagctcat tgagcttgcc gataaggctg gaccttatgt gtgcatgac 600  
aagaccata tcgacatcat tgacgacttc acctacgccc gcactgtgct cccctcaag 660  
gaacttgctc ttaagcacgg ttcttctctg ttcgaggaca gaaagttcgc agatattggc 720  
aacactgtca agcaccagta caagaacggt gtctaccgaa tcgccgagtg gtccgatatc 780  
accaacgccc acggtgtacc cggaaccgga atcattgctg gcctgcgagc tggcgccgag 840  
gaaactgtct ctgaacagaa gaaggaggac gtctctgact acgagaactc ccagtacaag 900  
gagttcctgg tcccctctcc caacgagaag ctggccagag gtctgctcat gctggccgag 960  
ctgtcttgca agggctctct ggccactggc gactactcca agcagaccat tgagcttgcc 1020  
cgatccgacc ccgagttgt gggtggcttc attgccaga accgacctaa gggcgactct 1080  
gaggactggc ttattctgac cccgggggtg ggtcttgacg acaagggaga cgctctcgga 1140  
cagcagtacc gaactgttga ggatgtcatg tctaccgga cggatatcat aattgtcggc 1200  
cgaggtctgt acggccagaa ccgagatcct attgaggagg ccaagcgata ccagaaggct 1260  
ggctgggagg cttaccagaa gattaactgt tagaggtag actatggata tgcatttaa 1320  
ctgtgtatat agagagcgtg caagtatgga gcgcttgctc agcttgatg atggtcagac 1380  
gacctgtctg atcgagtatg tatgatactg cacaacctgt gtatccgcat gatctgtcca 1440  
atggggcatg ttgttgtgt tctcgatacg gagatgctgg gtacaagtag ctaatacga 1500  
tgaactactt atacttatat gaggcttgaa gaaagctgac ttgtgtatga ctattctca 1560  
actacatccc cagtcacaat accaccactg cactaccact acacaaaac catgatcaaa 1620  
ccaccatgg acttcttga ggcagaagaa cttgttatgg aaaagctcaa gagagagaag 1680  
ccaagatact atcaagacat gtgtcgcaac ttcaaggagg accaagctct gtacaccgag 1740  
aaacaggcta gctcgtcgtg ttcaggaact gttcgatggt tcggagagag tcgccgcca 1800



14/18

gaacatacgc gcaccgatgt cagcagacag ccttattaca agtatattca agcaagtata 1860  
tccgtaggggt gcgggtgatt tggatctaag gttcgtactc aacactcacg agcagcttgc. 1920  
ctatgttaca tccttttacc agacataaca taattggagt ttacttacac acgggggtgta 1980  
cctgtatgag caccacctac aattgtagca ctggtacttg tacaagaat ttattcgtac 2040  
gaatcacagg gacggccgcc ctaccgaac cagcgaatac ctacgaggtc ccctgcagtg 2100  
actcaacaaa gcgatatgaa catcttgca iggtatcctg ctgatagttt ttactgtaca 2160  
aacacctgtg tagctcctc tagcatTTTT aagtattca cacctcaagg ggagggataa 2220  
attaaataaa ttccaaaagc gaagatcgag aaactaaatt aaaattccaa aaacgaagt 2280  
ggaacacaac ccccgaaaa aaaacaacaa acaaaaaacc caacaaaata aacaaaaaca 2340  
aaataaatat ataactacca gtatctgact aaaagttcaa atactcgtac ttacaacaaa 2400  
tagaaatgag ccggccaaaa ttctgcagaa aaaaatttca aacaagtact ggtataatta 2460  
aattaaaaaa cacatcaaag tatcataacg ttagttattt tttttattt aataaaagaa 2520  
aacaacaaga tgggctcaaa actttcaact tatacgatac ataccataa acaatttagt 2580  
atttatctaa gtgcttttcg tagataatgg aatacaaatg gatattcaga gtatacacat 2640  
ggatagtata cactgacacg acaattctgt atctctttat gttaactact gtgaggcatt 2700  
aaatagagct tgatatataa aatgttacat ttacagctct gaacttttgc agattaccta 2760  
atttggtgag atattaatta tgaactgaaa gttgatggca tccctaaatt tgatgaaaga 2820  
tgaaattgta aatgagggtg taaaagagct acagtcgttt tgttttgaga taccatcatc 2880  
tctaacgaaa tatctattaa aaatctcagt gtgatcatga gtcattgccca tcttgaaaaa 2940  
tgtcatcatg gctgatattt ctaactgttt acttgagata aatatatatt tacaagaact 3000  
tcccttgaaa ttaattaga tataaatgt ttgcgggcaa gtactacga ggaataaatt 3060  
atatctgtg actagaagtt atgaacattc agtatatatg cacatataat aaccaactc 3120  
ggccctttcg tctcgcgctg ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 3180  
cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcaggggcg 3240  
cgtcagcggg tgttggcggg tgcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 3300  
tactgagagt gcaccatacg cgcgctatag ggcaattgg agctccaccg cgttggcggc 3360  
cgctctagaa ctagtggatc cccgggctg caggaattcg atatcaagct tatcgatacc 3420  
gtcgacctcg agggggggcc cggtaaccag ctttgtccc tgcgcgctat gcggtgtgaa 3480  
ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacaggc gctgcattaa tgaatcggcc 3540

15/18

aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc ctaggcaatt aacagatagt 3600  
ttgccgggtga taattctctt aacctccac actcctttga cataacgatt tatgtaacga 3660  
aactgaaatt tgaccagata ttgttgtaa tagaaaatct ggctttagg tggcaaatc 3720  
ccgtctttgt tcatcaattc cctctgtgac tactcgtcat cctttatgt tcgactgtcg 3780  
tatttcttat ttccataca tatgcaagt agatgcccgt gtccctctcg ctactgact 3840  
cgctgcgctc ggctgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tctactcaaag gcggaatac 3900  
ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa 3960  
aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgtttt ccataggctc cgccccctg 4020  
acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca ggactataaa 4080  
gataccagge gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttcg accctgccgc 4140  
ttaccggata cctgtccgcc ttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct caatgctcac 4200  
gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt gtgcacgaac 4260  
ccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag tccaacccgg 4320  
taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cacttggtaa caggattagc agagcgaggt 4380  
atgtaggcgg tgctacagag ttctgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga 4440  
cagtatttg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacct cggaataaga gttgtagct 4500  
cttgatccgg caaacaacc accgctggtg gcggtggtt ttgtgttc aagcagcaga 4560  
ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atccttgat ctttctacg ggtctgacg 4620  
ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaggga tttggtcat gagattatca aaaaggatct 4680  
tcacclagat ccttttaa ataaaaatgaa gtttaaact aatctaaagt atatatgagt 4740  
aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc 4800  
tatttcgtc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg 4860  
gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag 4920  
attatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt 4980  
tatccgcctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag 5040  
ttaatagtt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca cgctcgtcgt 5100  
ttggtatggc ttcattcagc tccggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca 5160  
tgttgtcaa aaaagcgggt agctcctcg gtctccgat cgttgtcaga agtaagtgg 5220  
ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat 5280

16/18

ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtga 5340  
tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca 5400  
gaactttaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct 5460  
taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat 5520  
cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaaa 5580  
agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcactact cttcctttt caatattatt 5640  
gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat attgaatgt atttagaaaa 5700  
ataaacaat aggggttccg cgcacattc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa 5760  
ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacg 5804

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; linker DNA

&lt;400&gt; 20

tactctagag

10

&lt;210&gt;21

&lt;211&gt;1820

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Candida maltosa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;CDS

&lt;222&gt;538..1413

17/18

&lt;223&gt;Adel

&lt;400&gt;21

gatcccttc ttcaaacctt taaatgacat tgttcgttt ctctatgttt ggtatcggtt 60  
cttctcttc ttcaaaaaa agggggggcac tattcaaaaa aaaatattat aacagtatga 120  
ttttttccc tctcccgctg attgaggttt ttttttctc ttcgtcttg gtcttttgc 180  
ttcactcca aaaatggaaa cacgcgcggc tcaactcgaa atccgtgatc aaaaaataa 240  
aggctgtgag ttctgagcca ataattatga attagtggta tttttttaa agataataa 300  
tcaagaatcg cattagggag acgaatatgc gttattcaaa taaaagaca attcttttag 360  
ggtagcattt ccttcaagt tcatcccaca tgtacattaa tgtcaatgat gtcgcagaag 420  
ttaaattagc agaagaaaa aaaatgtga attactcca gtcaactctt cttctcttc 480  
ttcttttct tctttatcac cataatcac accaccacca ccaccaccag ctcccagatg 540  
acttcaacta acttagaagg aactttcca ttgattgcca aaggtaaagt cagagatatt 600  
taccaagtg acgacaacac tctttattc gttgctactg atagaatttc cgcatacgat 660  
gtgattatgt ctaatggtat cccaaataaa ggtaaaatct taaccaaatt gtctgaattc 720  
tggtttgatt tcttgccaat tgaaaaccat ttaatcaaag gagacatttt ccaaaaatat 780  
cctcaactag aaccatatag aaaccaattg gaaggcagat ccttacttgt tagaaaattg 840  
aaattgatcc ctctgaagt tattgttaga ggttacctca ccggttccgg ctggaaagaa 900  
tacaaaaat ctaaaaccgt ccacgggtatt cctattgggtg atgtgggtga atcacaacaa 960  
atcactccta tcttcccc atccactaaa gcagaacaag gtgaacatga tgaaaatatt 1020  
accaaagaac aagctgacaa gattgttgga aaagaattat gtgatagaat tgaaaaatt 1080  
gctattgatt tgtacaccaa agccagagat tacgctgcca ctaaaggaat tattatcgct 1140  
gatactaaat ttgaatttg ttagatggg gacaacatcg ttcttgtga cgaagtttta 1200  
actccagatt ctccagatt ctggaatgct gctaaatcg aagttggtaa atctcaagac 1260  
tcttacgata aacaatttt gagagattgg ttaacttcta atgggtgtgc tggtaaagat 1320  
gggtgtgcta tgcctgaaga cattgtcact gaaaccaaga gcaaatacgt tgaagcttac 1380  
gaaaatttaa ctggtgacaa atggcaagaa taaattaagg atatctatta ttaaagcttt 1440  
ctatttatcc caaacttcg tagtatttc tgacatgttc agatgtttt actttatctt 1500  
tctgaaatt ttgatttct aaccgactct tgcatttagc tcttgataat gcaacatatg 1560

18/18

cttgaccatt agcaaaactt ctacctaaat ctatttgac tctgtccaaa gtttgacctt 1620

gagctttgtg gatcgacatc gccacgaca agatcattg gtttgtttt atggtgggtt 1680

attggcactt ggtgcaactg atggtttaac ttggaagag gctaagaaat tgaagacttg 1740

gaatgaagaa cgtgcatctg atttcaaatt ggggaagaa ttgacttata ctgtttataa 1800

aatgtatcat gatgtgatc

1820

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04158

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 1/19, C12P 7/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS/BIOSIS/CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-108682 A (Rikagaku Kenkyusho), 28 April, 1998 (28.04.98), & EP 824148 A2 & US 5981257 A	1-23
X Y	Timothy A. Leaf et al., "Sarccharomyces cerevisiae expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate", Microbiology, (1996), Vol.142, No.5, pages 1169 to 1180	1 2-23
X Y	Toshiaki Fukui et al., "Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of Aeromonas caviae establishes copolyester biosynthesis pathway in Escherichia coli, FEMS Microbiology Letters, (1999), Vol.170, No.1, pages 69 to 75	1 2-23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing  
date"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
cited to establish the publication date of another citation or other  
special reason (as specified)"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
means"P" document published prior to the international filing date but later  
than the priority date claimed"T" later document published after the international filing date or  
priority date and not in conflict with the application but cited to  
understand the principle or theory underlying the invention"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
step when the document is taken alone"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
considered to involve an inventive step when the document is  
combined with one or more other such documents, such  
combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 August, 2001 (08.08.01)Date of mailing of the international search report  
21 August, 2001 (21.08.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/52, C12Q 1/19, C12P 7/62

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/52, C12N 1/19, C12P 7/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 10-108682 A (理化学研究所) 28.4月.1998 (28.04.98) & EP 824148 A2 & US 5981257 A	1-23
<u>X</u> Y	Timothy A. Leaf et. al, Sarccharomyces cerevisiae expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3- hydroxybutyrate. Microbiology, 1996, Vol.142, No.5, p.1169-1 180	<u>1</u> 2-23

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 08.08.01

国際調査報告の発送日 21.08.01

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
深草 亜子



4B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Toshiaki Fukui et.al, Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of Aeromonas caviae establishes copolyester biosynthesis pathway in Escehrichia coli. FEMS Microbiolgy Letters, 1999, Vol.170, No.1, p.69-75	<u>1</u> 2 - 2 3